



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**Regulación de la expresión de
desaturasas en *Mycobacterium
tuberculosis* y *Mycobacterium
smegmatis***

Presentada por Mariana Doprado

Dirección:
Larisa Estefanía Cybulski
Héctor Ricardo Morbidoni

Rosario, Argentina
2013

Regulación de la expresión de desaturasas en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*

Mariana Doprado

Microbióloga

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Río Cuarto

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre el mes de abril de 2009 y septiembre de 2013, bajo la dirección de la Doctora Larisa Estefanía Cybulski y la codirección del Doctor Héctor Ricardo Morbidoni.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, por enseñarme a ser persona, por llevarme por el camino de la verdad y darme la libertad de elegir y decidir sobre mis actos. Por darme la posibilidad de estudiar y formarme como profesional. Los Amo

A mis hermanos, por ser compañeros de viaje en este camino de la vida.

A mi abuela, que me cuida desde algún lugar, por abrirme las puertas de su casa y acompañarme en momentos importantes.

A mis amigas Cari, Cintia, Yami, Leti, Uvi, Vicky, Vani, Vero por alegrarme la vida, por ser mis compinches desde cerca pero sobre todo desde lejos.

A mi ahijada hermosa, Manu, sos tan importante en mi vida mi pequeña!.

A mis compañeros de laboratorio, Jole, Juan, Emma, Vir A., Vir B., Naty, Sabri, Vir F., Cristian, Ana, Agus. El día a día se hace mucho más fácil y divertido con gente como ustedes. Gracias por ayudarme y aguantarme.

A Ricardo y Larisa, por enseñarme, guiarme y no soltarme la mano aún en los momentos difíciles. Gracias Ricardo por permitirme formar parte de su grupo y darme un lugar en el que me sentí muy cómoda.

Al director y personal del IBR por facilitarnos el uso de equipamientos y materiales.

A Diego, mi amor, mi compañero, mi sostén, mi referente. Gracias por estar a mi lado, por amarme, aguantarme y ayudarme en todo lo que emprendo. Sos un gran compañero mi amor!

Parte de los resultados que se describen en este trabajo han sido dados a conocer en las siguientes reuniones científicas:

Doprado, M.; Belardinelli, J.M; Morbidoni, H.R.

“Low temperature and thiacetazone reveal synthesis of new mycolic acids in *Mycobacterium smegmatis*”

XLVL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Puerto Madryn, Chubut, 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2010.

Doprado, M., Morbidoni, H.R.; Cybulski, L.E.

“Regulation of Unsaturated Fatty Acid synthesis in *Mycobacterium*”

VII Congreso Argentino de Microbiología General, organizado por la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE), San Miguel de Tucumán, 18 al 20 de mayo de 2011.

Doprado, M., Cybulski, L.E., M., Morbidoni, H.R.

“A *desA3* knock-out *Mycobacterium smegmatis* mutant is unable to synthesize palmitoleic acid”.

XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Potrero de los Funes, San Luis, 31 de octubre al 2 de noviembre de 2011.

Doprado, M; Cybulski, L.E.; Morbidoni, H.R.

“A *desa3* knock-out *Mycobacterium smegmatis* mutant is unable to synthesize palmitoleic acid”.

VI reunión SLAMTB, Bucaramanga, Colombia, 26 al 28 de septiembre 2012.

Doprado, Mariana¹; Cybulski, Larisa E.²; Morbidoni, Héctor R.

“Temperature regulated fatty acid desaturases in *Mycobacterium smegmatis*”

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mendoza, 29 de octubre al 1 de noviembre de 2012.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1.1 El género <i>Mycobacterium</i> . Generalidades	3
2.1.2 La envoltura celular de las micobacterias	3
2.2 Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias	6
2.2.1 Consideraciones generales	6
2.2.2 Las Sintetasas de Ácidos grasos	7
2.2.3. Ácidos grasos insaturados. Vías de síntesis	10
2.2.4 Desaturasas.	11
2.2.4.1. Clasificación. Generalidades.	11
2.2.4.2. Reacción de desaturación	13
2.3. Regulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados en organismos que poseen desaturasas.	15
2.3.1 Sistema DesK-DesR de <i>B. subtilis</i>	15
2.3.2 Sistema OLE1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3.3 Sistema DesA-DesB de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	17
2.4 Antecedentes sobre sistemas desaturantes en micobacterias.	17
3. OBJETIVOS	19
3.1.1 OBJETIVO GENERAL	19
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Cepas bacterianas	20
4.2 Medios de cultivo	20
4.3 Antimicrobianos	23

4.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM99)	24
4.5 Vectores de clonado y expresión	24
4.6 Oligonucleótidos cebadores utilizados	25
4.7 Extracción de ADN para Reacción en Cadena de la Polimerasa	26
4.8 Electroporación de <i>E. coli</i>	27
4.9 Electroporación de <i>M. smegmatis</i>	27
4.10 MANIPULACION DE ADN	28
4.10.1 Preparación de ADN plasmídico	28
4.10.2 Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasa alcalinas	29
4.10.3 Secuenciación de ADN	29
4.10.4 Purificación de ADN de geles de agarosa	29
4.10.5 Clonado de genes	29
4.11 Curvas de crecimiento	30
4.12 Análisis de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos	31
4.13 Determinación de actividad β -galactosidasa	32
4.14 Construcción de una mutante delecional en el gen <i>MSMEG_1886</i>	33
4.15 Sobreexpresión de las desaturasas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	34
4.16 Construcción de ARNm antisentido.	34
4.17 Extracción de ARN total	35
4.18 Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)	35
5. CAPÍTULO I	37
5.1 Efecto de la temperatura sobre la síntesis de ácidos grasos en <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	37
5.1.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>M. smegmatis</i>	

mc ² 155.	37
5.1.2 Efecto de la temperatura sobre la composición lipídica de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	38
5.2.1 Análisis genómico de las desaturasas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	42
5.2.2 Análisis de la expresión transcripcional de las desaturasas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	46
5.2.3 Efecto de la temperatura sobre la expresión.	47
5.2.4 Efecto del ácido oleico sobre la expresión transcripcional de las desaturasas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	48
5.3 DISCUSIÓN	51
6. CAPÍTULO II	57
6.1 Caracterización funcional de Des1886	57
6.1.1 Construcción de una mutante delecional en el gen <i>MSMEG_1886</i>	57
6.2 Caracterización fenotípica de la cepa UNRΔ1886	58
6.2.1 Crecimiento en medio líquido	58
6.2.2 Crecimiento en medio sólido	60
6.2.3 Análisis de la composición lipídica	61
6.2.4 Análisis del efecto de isoxil (ISO) sobre el crecimiento.	65
6.3 DISCUSIÓN	68
7. CAPÍTULO III	73
7.1 Caracterización funcional de Des1211, Des1743 y Des6835	73
7.1.1 Características estructurales de las desaturasas de <i>M. smegmatis</i> .	73
7.1.2 Complementación funcional de <i>M. smegmatis</i> UNRΔ1886 con las desaturasas Des1211, Des1743 y Des6835.	74

7.2 Construcción de mutantes delecionales	77
7.3 Construcción de ARNm antisentido	78
7.4 DISCUSIÓN	85
8. CONCLUSIONES	89
9. RESÚMEN	91
10. BIBLIOGRAFÍA	93

1. ABREVIATURAS

ACC	acetil CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADS	Albúmina-Dextrosa-NaCl
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
C	Carbono
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CoA	Coenzima A
cpm	Centelleos por minuto
CV	cristal violeta
Des	desaturasa
DMDS	dimetil-disulfuro
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
FAD	flavina adenina dinucleótido
FAMEs	Metil Ésteres de Ácidos Grasos
FAS	Ácido graso sintasa
Fd	ferredoxina
FNR	ferredoxina-NADP+ óxidoreductasa
GC-MS	cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
GT	Glicerol + Tritón
H₂O_d	Agua Destilada
Hig	Higromicina
HTH	<i>helix turn helix</i> (hélice vuelta hélice)
ISO	Isoxil
IVN	isovaleronitrilo
Kan	Kanamicina
Kb	kilo base

kV KiloVoltio

LAM Lipo Arabino Manano

LM mipomanano

LB Luria Bertani

MAMEs Metil Ésteres de Ácidos Micólicos

NADH nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Nov novobiocina

OADS Ácido Oleico-Albúmina-Dextrosa-NaCl

ONPG orto-nitrofenilgalactopiranosido

PADS Ácido Palmitoleico-Albúmina-Dextrosa-NaCl

pb Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PIM fosfatidil inositol manósido

rpm Revoluciones por minuto

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

Rif rifampicina

SDS Dodecil sulfato de sodio

Succ succinato

TAC Tiacetazona

TBHA hidróxido de tetrabutyl amonio

TDM dimicolato de trehalosa

TMM monomicolato de trehalosa

TLC Cromatografía en capa delgada

2. INTRODUCCIÓN

2.1.1 El género *Mycobacterium*. Generalidades

El género *Mycobacterium* pertenece al Phylum y Clase *Actinobacteria*, Orden *Actinomycetales* y es el único género de la familia *Mycobacteriaceae*. Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variable (bacilar o cocoide), que no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula. Las especies de este género presentan además un elevado contenido de G+C (61-71%) en su ADN. Poseen una pared celular de estructura Gram negativa con un elevado contenido lipídico que supone el 60% del peso seco de la misma. Esta composición de la pared le confiere a las micobacterias la característica ácido-alcohol resistencia que permite su visualización microscópica mediante la tinción de Ziehl-Neelsen pero no mediante la tinción de Gram, además de una escasa permeabilidad celular, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos. Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 100 especies que pueden clasificarse de múltiples maneras, por ejemplo, según la velocidad de crecimiento, la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos. Así, se establecieron diferentes grupos: **micobacterias de crecimiento lento y rápido** (según requieran más o menos de 7 días, respectivamente, para producir colonias visibles en un subcultivo sólido con un inóculo diluido); **no cromógenas, escotocromógenas y fotocromógenas** (según no produzcan pigmentos o lo hagan en ausencia o presencia de la luz, respectivamente). También se agrupan según sean especies **saprófitas** (como *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. aurum* y otras), **patógenas oportunistas** (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. abscessus*) y **patógenas estrictas** (como *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. leprae*) [5], [6]

2.1.2 La envoltura celular de las micobacterias

La envoltura celular de las micobacterias es una estructura compleja compuesta por un gran porcentaje de lípidos y le confiere a estos organismos tanto una baja permeabilidad como así también la característica de ácido alcohol resistencia como se mencionó anteriormente. Esta gran

cantidad de lípidos explica además la tendencia de las micobacterias de crecer formando grumos en medio líquido.

Esta envoltura consiste en dos partes estructurales: la **membrana plasmática** y la **membrana externa**. La estructura básica de la **membrana plasmática** micobacteriana no difiere sustancialmente de la membrana de otras bacterias, de acuerdo con su ultraestructura, composición química y funciones metabólicas [7-9]. Los lípidos polares están compuestos por cabezas hidrofílicas y ácidos grasos tanto saturados como insaturados y mono-metil ramificados de longitud menor a 20 átomos de carbono. Los principales ácidos grasos en la membrana de las micobacterias son ácido palmitoleico (C16:1), ácido oleico (C18:1) y ácido tuberculosteárico (C18:0 CH₃). Entre los fosfolípidos más abundantes se encuentran fosfatidilinositol manósidos (PIMs), fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidiletanolamina [10].

La **membrana externa** es una macromolécula químicamente compuesta por tres constituyentes unidos covalentemente: péptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos. [7, [11, 12]. También se encuentran asociados diferentes lípidos denominados extraíbles (o no unidos covalentemente). Entre ellos se encuentran fosfatidilmioinositol manósidos (PIMs) y lipoglicanos (Lipoarabinomananos-LAM- y lipomananos -LM-) [12-14]. Además del rol estructural que cumplen estos últimos lípidos, se puede mencionar su rol en la modulación de la respuesta inmune del hospedador durante procesos infecciosos [15],[16] (Figura 1).

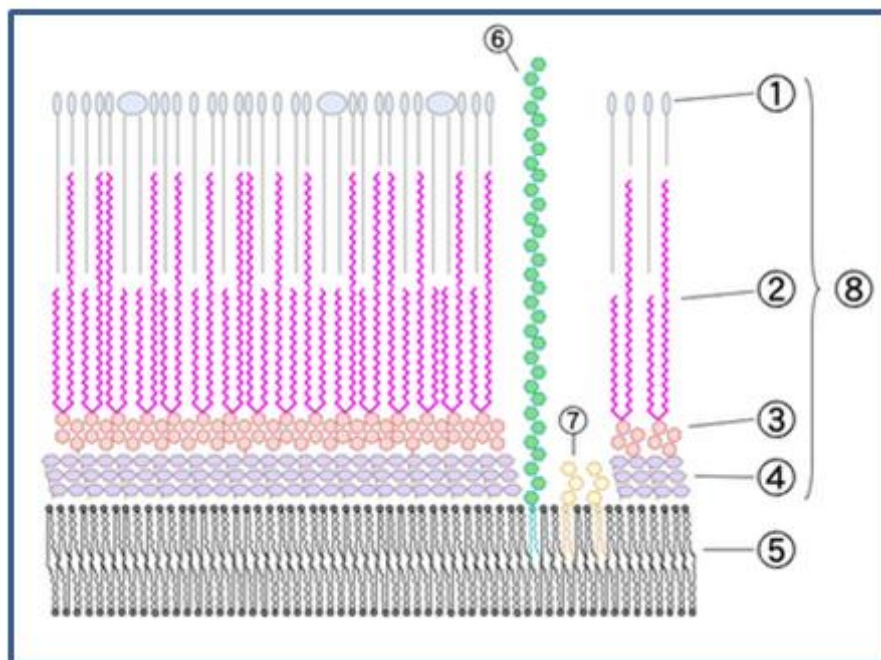


Figura 1. Esquema de la envoltura celular micobacteriana: 1) Lípidos extraíbles, 2) Ácidos Micólicos, 3) Arabino-Galactano, 4) Peptidoglicano, 5) Membrana Citoplasmática, 6) Lipo Arabino Manano, 7) Fosfatidil Inositol Manósido 8) Pared celular

Los ácidos micólicos constituyen los componentes mayoritarios y más específicos de la envoltura de las micobacterias y juegan un rol crucial en su exquisita arquitectura e impermeabilidad. Químicamente son α -alquil β -hidroxi ácidos grasos de cadena de 90 o más átomos de carbono que pueden encontrarse libres, como ésteres de trehalosa (dimicolato de trehalosa TDM o monomicolato de trehalosa TMM), o glicerol, o bien, en su mayoría esterificados al esqueleto de arabinogalactano-peptidoglicano [17], [18], [19]. Su estructura molecular consta de una cadena principal, denominada ácido meromicólico (C50-C60), con una cadena de alquilo en posición α (con una longitud de entre C22 y C26, dependiendo de la especie micobacteriana) y un grupo hidroxilo en posición β .

Si bien se ha estudiado intensamente la biogénesis de las distintas moléculas que forman parte de la envoltura celular, se sabe mucho menos de su organización física y se han planteado diversos modelos para la organización de la misma [20], [21]. Recientemente, se analizó la organización física de los lípidos de la envoltura de *M. smegmatis* y *M. bovis* utilizando una técnica de tomografía crio electrónica, confirmando que las micobacterias poseen una membrana externa en forma de bicapa lipídica, constando de una capa externa moderadamente fluida, constituida por los

lípidos extraíbles, y de una capa interna de extremadamente baja fluidez, donde se localizan los ácidos micólicos y otros lípidos apolares [22].

2.2 Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias

2.2.1 Consideraciones generales

Los lípidos son constituyentes fundamentales de todas las células por ser componentes estructurales de las membranas. Además, constituyen una fuente de reservas de carbono y energía. Una célula puede hacer muchos tipos diferentes de lípidos, algunos de los cuales se sintetizan sólo bajo ciertas condiciones o tienen funciones especializadas. En consecuencia, la biosíntesis de lípidos constituye una de las vías de síntesis principales en todas las células [3].

La biosíntesis de ácidos grasos es el primer paso en la formación de los lípidos de membrana y es esencial para todas las células, excepto para las Archeas, cuyos lípidos de membrana están compuestos por éteres de glicerol con cadenas isoprenoides [23].

En *Escherichia coli*, los ácidos grasos se sintetizan a partir de unidades de dos átomos de carbono mediante la ayuda de una proteína transportadora de acilos ACP (de su sigla en inglés *Acyl Carrier Protein*) [3]. El primer paso consiste en la carboxilación de una molécula de acetil-CoA mediante una acetil-CoA carboxilasa (ACC) para formar malonil-CoA, que quedará disponible para las demás enzimas de la vía una vez que se convierta en malonil-ACP por la malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD). Los pasos de elongación posteriores consisten en series sucesivas de adición de unidades de dos carbonos a la cadena acilo creciente que se encuentra unida covalentemente a ACP. El primer paso en la elongación comienza por una condensación de tipo Claisen de malonil-ACP con acetil-CoA catalizada por la enzima condensante β -cetoacil-ACP sintetasa III o FabH para formar β -cetoacil-ACP. Los ciclos adicionales de elongación de la vía son catalizados por las enzimas condensantes FabF-FabB, que condensan malonil-ACP con la cadena acil-ACP de a dos carbonos en cada ciclo. Este paso es irreversible y por lo tanto un punto importante de regulación de la vía. El ciclo se completa con la reducción, deshidratación y nueva reducción del grupo β -ceto mediante tres enzimas: la β -cetoacil-ACP reductasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) dependiente (o FabG), β -hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabZ o FabA) y enoil-ACP reductasa (dependiente de NADPH o NADH, FabI o FabL, respectivamente). Cuando se completa

cada ciclo, la cadena acilada es transferida a la ceto-sintetasa para recomenzar el próximo ciclo [24] (Figura 2).

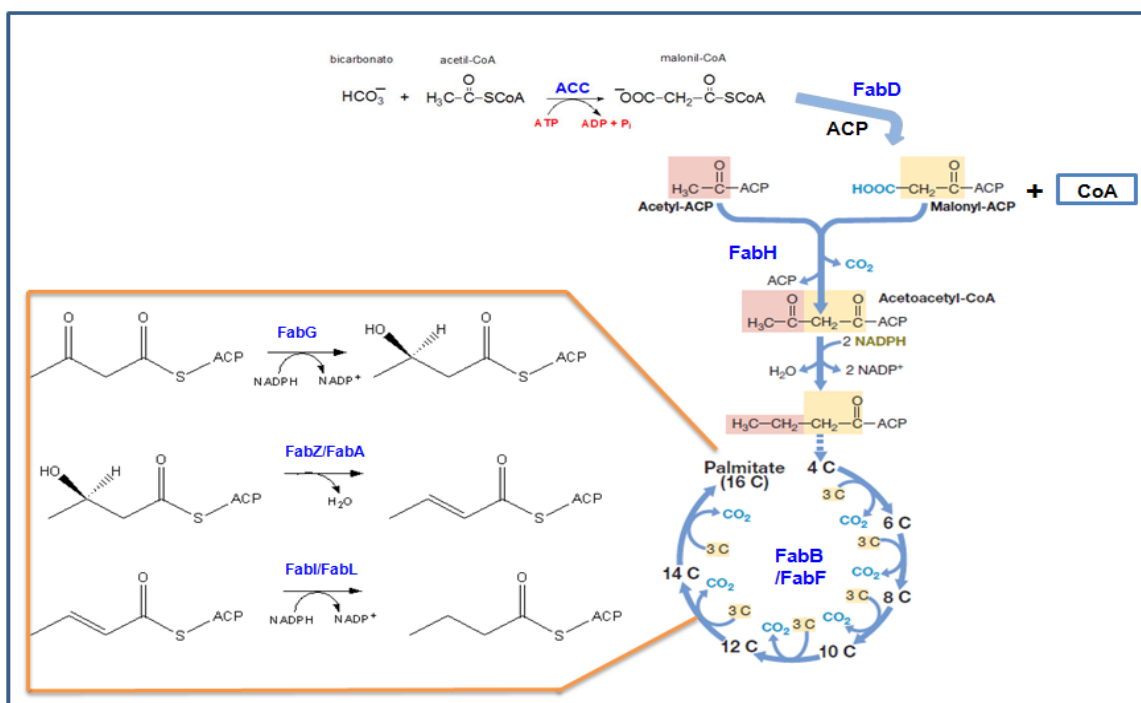


Figura 2. Biosíntesis esquemática de palmitato (C₁₆). La condensación de acetil-ACP y malonil-ACP forma acetoacetyl-ACP. Cada adición sucesiva de una unidad acetilo proviene del malonil-ACP. Se esquematizan los pasos de reducción, deshidratación, reducción del grupo β-ceto en la vía de síntesis de ácidos grasos catalizados por las enzimas FabG, FabZ/FabA y FabI/FabL, respectivamente [2] [3].

Sin embargo, aunque el paradigma de *E. coli* provee información sólida para diferentes sistemas de estudio, los detalles bioquímicos de cada vía de síntesis de lípidos en particular no pueden ser inferidos a partir de este sistema. Así, por ejemplo, existen diferencias relevantes entre *E. coli* y actinomicetes [25].

2.2.2 Las Sintetasas de Ácidos grasos

En base a las características estructurales y funcionales de las proteínas que componen las sintetasas de ácidos grasos (denominadas de aquí en más **FAS**, por su sigla en inglés *Fatty Acid*

Synthetase), estos sistemas se clasifican en tipo I o tipo II (FASI y FASII). **FASII** consiste en un sistema formado por enzimas disociadas altamente conservadas codificadas por genes separados. Este sistema se encuentra en bacterias y parásitos y también en mitocondrias y cloroplastos de células eucariotas y es capaz de sintetizar ácidos grasos *de novo* (excepto en bacterias productoras de ácidos micólicos) a partir de acetil-CoA [26, 27]. El sistema **FASI** típico consiste en una proteína multifuncional que contiene todos los dominios catalíticos en un polipéptido. Este sistema es típico de eucariotas [28] (pero no de plantas) y también se encuentra en procariotas actinomicetes productores de ácidos micólicos [29].

Los sistemas FASI pueden ser sub-divididos de acuerdo a la organización de sus dominios y al estado de oligomerización, [30]. FASI de *Mycobacterium* y *Corynebacterium* es un hexámero con una distribución de dominios que difiere de la de FASI de animales [28]. Además FASI de animales libera ácidos grasos libres mediante un clivaje hidrolítico catalizado por una tioesterasa, mientras que FASI de micobacterias y corinebacterias (también de levaduras), utiliza una actividad malonil/palmitoil transferasa para realizar una transacilación de palmitato (u otro producto final) hasta ACP. Estos Acil-ACP ingresarán luego a FASII para ser elongados y proseguir en la vía de síntesis de los ácidos micólicos [31] [32] (Figura 3). La elongación de los acil-CoAs por FASI tiene un comportamiento bimodal, es decir, produce ácidos grasos C16-C18 (que servirán de precursores para FASII y para la síntesis de fosfolípidos) y C22-C26 (que formarán la ramificación en α del ácido micólico). Esta es una característica exclusiva de FASI de micobacterias [33, 34].

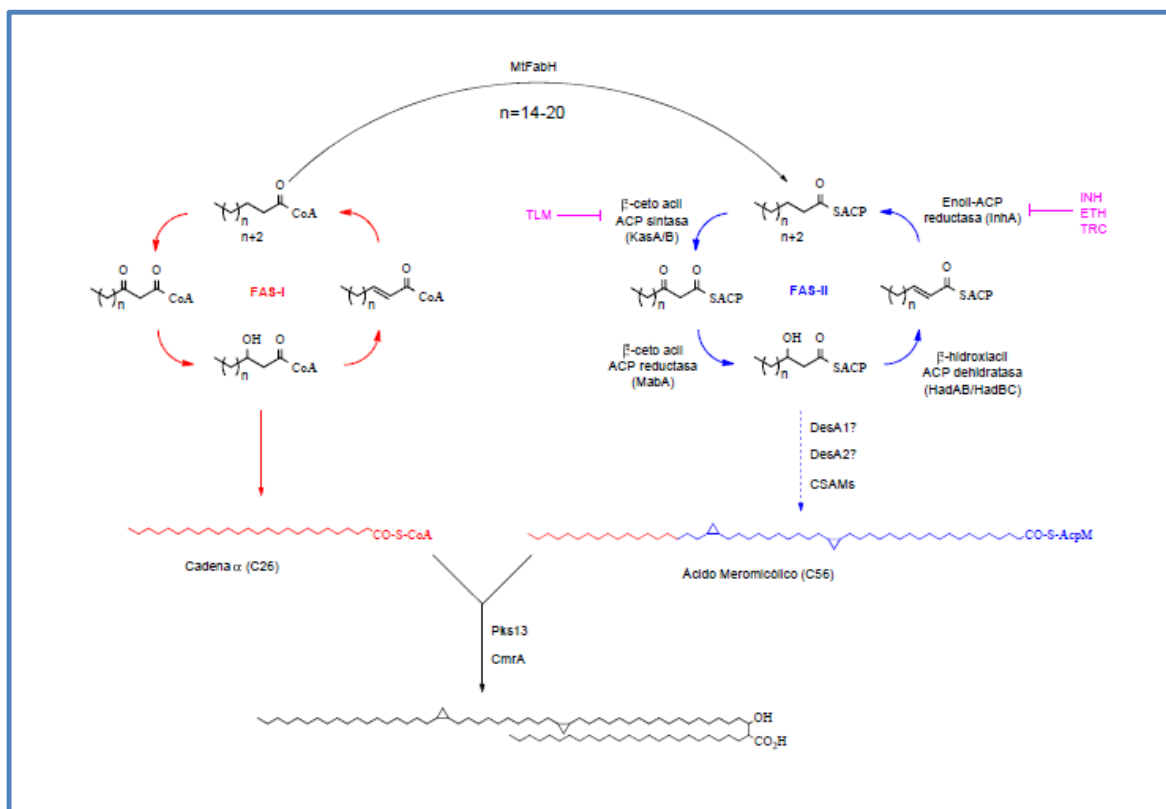


Figura 3: Biosíntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos en micobacterias. La contribución de FASI y FASII en la síntesis de ácidos micólicos se muestra en rojo y azul, respectivamente. El sitio de inhibición de FASII de distintos compuestos antimicobacterianos se encuentra resaltado en violeta.

En *M. tuberculosis*, la enzima β-cetoacil-ACP sintasa III, MtFabH (*Rv0533c*) conecta FASI y FASII, catalizando la condensación de los acil-CoAs provenientes de FASI con malonil-ACP [35]. De esta manera, el sustrato inicial de FASII es un β- cetoacil-ACP de cadena mediana. Luego este sustrato es reducido por la β-cetoacil-ACP reductasa MabA (*Rv1483*), deshidratado por las hidroxiacl-ACP deshidratasas HadAB (*Rv0635-0636*) y HadBC (*Rv0636-0637*) y reducido por la enoil-ACP reductasa InhA (*Rv1484*) [36] [37, 38]. Las β- cetoacil-ACP sintasas KasA (*Rv2245*) y KasB (*Rv2246*) catalizan la condensación con unidades de malonil-ACP para continuar con la extensión [39, 40]. Una vez sintetizado el ácido meromíclico la enzima Pks13 (*Rv3800c*) es la encargada de realizar la condensación de éste con un ácido graso de 22C-26C (dependiendo de la especie) proveniente de FASI dando como producto un intermediario β-cetoacil ácido graso [41] que luego es reducido por la reductasa CmrA (*Rv2509*) para dar el ácido micólico maduro [42] que

posteriormente será transportado a la pared y transferido a un aceptor final como el arabino galactano o la trehalosa.

2.2.3. Ácidos grasos insaturados. Vías de síntesis

Las membranas biológicas forman una barrera que permite una compartimentalización de los procesos bioquímicos de las células [43]. Para mantener sus funciones activas, las bicapas lipídicas deben mantener un estado dinámico adecuado, aún ante cambios ambientales que pueden alterar su fluidez correcta [44]. Esto se logra mediante una reestructuración de la composición de los lípidos que la componen. A través de la síntesis de una combinación adecuada de cadenas aciladas y cabezas polares, los organismos pueden mantener los lípidos de membrana en un estado lamelar cristalino y evitar la formación de un estado lamelar en gel [45]. Una de las adaptaciones más relevantes ante los cambios de temperatura, pH, actividad de agua, concentración de oxígeno y otros factores ambientales, es la proporción de insaturaciones en los ácidos grasos [46]. Otra adaptación importante para mantener un desorden molecular en las membranas biológicas es la ramificación de los ácidos grasos como en *B. subtilis*, o *Listeria monocytogenes* [47-53].

Los ácidos grasos insaturados (AGI), usualmente en configuración *cis* [54], tienen una temperatura de transición mucho menor que los ácidos grasos saturados (AGS) debido a que producen un impedimento estérico provocado por la torcedura que genera la cadena que contiene el doble enlace *cis*, lo que lleva en última instancia a un empaquetamiento menos rígido de las cadenas aciladas de los fosfolípidos y en consecuencia a una mayor fluidez. Por lo tanto, además de su rol estructural, los AGI son moléculas clave en la regulación de la fluidez de membrana y además resultan cruciales en procesos de señalización celular desde bacterias hasta humanos. [55].

La mayoría de los organismos (a excepción de algunas bacterias) tienen FAS que sólo pueden producir ácidos grasos saturados. Para la síntesis de AGI existen dos mecanismos mayoritarios: muchos procariotas, incluyendo a *E. coli*, sintetizan AGI por una vía anaeróbica mientras que otros organismos utilizan una vía de desaturación dependiente de oxígeno [56].

La **vía anaeróbica** de *E. coli* requiere de dos enzimas clave: FabA y FabB. FabA es una β -hidroxi decanoil deshidratasa/isomerasa que introduce dobles enlaces *cis* en un intermediario de 10 carbonos. FabB es una 3-cetoacil ACP sintetasa que cataliza la elongación del ácido graso en síntesis mediante la adición de unidades de dos carbonos, derivados de acetil Coenzima A [57, 58]. *E. coli* tiene tres enzimas de este tipo: FabB, FabF y FabH [59]. La ausencia de FabB produce

auxotrofia para AGI, por lo tanto, esto indica que esta enzima cataliza un paso en la vía de síntesis que no puede ser catalizado por FabF (ni por FabH, que sintetiza solamente acil-ACPs de cadena corta) [60]. FabB, entonces, elonga el producto de FabA hasta producir un intermediario de 12 carbonos, mientras que FabF se requiere para la síntesis de especies de 16 y 18 carbonos de longitud [61, 62] (figura 2).

Con el advenimiento de la secuenciación genómica se descubrió que los genomas que tenían genes con homología a FabA y FabB de *E. coli* estaban restringidos a las α y γ -proteobacterias. La ausencia de estos genes en algunos genomas se podía explicar por la ausencia de AGI en aquellos organismos. Sin embargo, en otros casos parecía que estos genes se habían perdido de los genomas, como en el caso de varios clostridios [63]. Existen casos particulares como el de *Streptococcus pneumoniae* que posee una isomerasa que carece de actividad dehidratasa (FabM) [64], mientras que *Enterococcus faecalis* posee homólogos funcionales de FabA y FabB que se parecen más en secuencia a FabZ y FabF que a los anteriores [65]. Por lo tanto, parece que las diferencias con el modelo de *E. coli* radican más en el tipo de proteínas que en la química de las reacciones.

La **vía de síntesis aeróbica** es llevada a cabo por desaturasas de ácidos grasos. Las desaturasas son proteínas que contienen un centro di-hierro no hemínico y comprenden una familia de enzimas que se encuentran en todas las células eucariotas [66-68], así como también en procariotas como cianobacterias, micobacterias y pseudomonas [63, 69, 70]. La reacción catalizada por estas enzimas es una desaturación dependiente de oxígeno de la cadena completa de un AGS (ya sea que ésta se encuentre como un acil-tioéster o como un ácido graso de un fosfolípido) y requiere una cadena de transporte de electrones específica, además de un donador de electrones.

2.2.4 Desaturasas.

2.2.4.1. Clasificación. Generalidades.

Las desaturasas han evolucionado a partir de dos linajes diferentes dando origen a dos grupos definidos [71]: desaturasas de ácidos grasos esterificados a ACP o **acil-ACP desaturasas**; enzimas solubles que se localizan principalmente en el estroma de plastidios de plantas superiores y desaturasas integrales de membrana que reconocen cadenas aciladas que se encuentran esterificadas a Coenzima A o a fosfolípidos, denominadas respectivamente **acil-CoA** o **acil-lípido desaturasas**.

Este grupo de enzimas se encuentra ampliamente distribuido y se localiza en sistemas de endomembranas en eucariotas y también en procariotas [72].

La disponibilidad de estructuras cristalográficas de acil-ACP desaturasas, como la 18:0 Δ^9 desaturasa de *Ricinus communis* [73, 74] y la desaturasa bifuncional de *Hedera hélix* [75, 76], permitió el estudio de estructura-función de estas proteínas. Las acil-ACP desaturasas son proteínas homodiméricas con cada monómero plegado en un único dominio compuesto por nueve hélices. El sitio activo di-hierro se encuentra inmerso en un bolsillo cubierto por cuatro hélices y un canal hidrofóbico estrecho en el cual se acomoda el sustrato. Las desaturasas llevan a cabo una reacción que es altamente estereo y regioselectiva .

Debido a las dificultades técnicas que conlleva la obtención de cantidades significativas de una proteína de membrana pura para su análisis, el entendimiento de las acil-CoA y acil-lípido desaturasas es comparativamente menor con respecto a las desaturasas solubles. Es por ello que los enfoques genéticos han sido de mayor utilidad que los enfoques bioquímicos en el estudio de estas enzimas [72]. Así, el análisis de la secuencia de aminoácidos correspondiente a genes de estas proteínas, muestra la ausencia del motivo de unión a hierro encontrado en las desaturasas solubles. En cambio, se encuentran varias histidinas conservadas en posiciones equivalentes en los dominios transmembrana. Este grupo de ocho histidinas conservadas comprende un motivo tripartito **HX**₍₃₋₄₎**HX**₍₇₋₄₁₎**HX**₍₂₋₃₎**HHX**₍₆₁₋₁₈₉₎**(H/Q)X**₍₂₋₃₎**HH** que se ha identificado en la mayoría de las desaturasas de membrana. Experimentos de mutagénesis sitio dirigida han demostrado que estas histidinas son esenciales para la catálisis [77-79]. Debido a la esencialidad de estos aminoácidos y a su localización en la cara citoplasmática de la membrana, es que se ha propuesto que estas histidinas están involucradas en la coordinación del centro de metal del sitio activo [78-80]. Un grupo de ocho histidinas conservadas se ha identificado también en dos monooxigenasas de *Pseudomonas*, AlkB y XylM, enzimas que median la hidroxilación de alcanos y xilanos, respectivamente [78, 81]. La identificación de este motivo conservado en diferentes proteínas implica que estos grupos están evolutivamente relacionados y se podría esperar que compartan mecanismos químicos. Por ejemplo, *Lesquerella fendleri* posee una 12-hidroxilasa bifuncional, que actúa parcialmente como desaturasa y parcialmente como hidroxilasa [82].

En cuanto al reconocimiento de un sustrato específico, las desaturasas tienen la habilidad de detectar tanto el número de carbonos como la posición donde se insertará el doble enlace. En este sentido, cada desaturasa tiene una especificidad diferente para la longitud de cadena de su sustrato.

Por ejemplo, las Δ^9 -18:0-ACP desaturasas son aproximadamente 100 veces más activas con 18:0-ACP que con 16:0-ACP, aunque también son capaces de reconocer a este sustrato [83-87].

En relación a la posición del doble enlace, existen tres tipos de regioselectividad que es la característica que define la posición de la insaturación [4, 88]. Las desaturasas con regioselectividad Δx introducen el primer doble enlace x átomos de carbono desde el extremo carboxilo terminal del ácido graso. Las desaturasas Δy , insertan un doble enlace en una posición y respecto del extremo metilo de la cadena acilada. Finalmente, las desaturasas $v+z$ requieren de un doble enlace preexistente como punto de referencia (v) y generan un nuevo doble enlace z átomos de carbono más alejados en la cadena. Estos modos de regioselectividad no son mutuamente excluyentes; tal es el caso de varias desaturasas bifuncionales como las $\Delta 12/\Delta 3$ desaturasas de hongos [89-92]. Una consecuencia interesante de la existencia de desaturasas bi- o multi-funcionales es que se presentan en el organismo con un rango de actividades biosintéticas potenciales según su expresión en diferentes tejidos o condiciones de crecimiento o bien según la disponibilidad de sustratos diferentes [93]. Además, la existencia de desaturasas solubles y/o de membrana no resulta una condición excluyente. El alga unicelular *Euglena gracilis*, constituye un caso particular de estudio porque posee los dos tipos de desaturasas descritos y utiliza uno u otro sistema en respuesta a las condiciones medioambientales. Condiciones de crecimiento fotoautotrófico resultan en la acumulación de la desaturasa soluble acil-ACP, mientras que el crecimiento heterotrófico favorece la acumulación de la acil-CoA desaturasa de membrana [94]. Independientemente de su localización subcelular, ambas desaturasas comparten características comunes. Las dos llevan a cabo una desaturación estereoespecífica $\Delta 9$ de un sustrato de 18 átomos de carbono [95, 96], ambas requieren oxígeno molecular [97, 98] y una cadena de transporte de electrones [99]. Ambas reacciones son inhibidas por cianuro pero no por monóxido de carbono [100-103].

2.2.4.2. Reacción de desaturación

Como se mencionó anteriormente, las desaturasas son enzimas que llevan a cabo reacciones de deshidrogenación que resultan en la introducción de dobles enlaces en cadenas aciladas. Para lograr esta reacción, las desaturasas reclutan y activan al oxígeno molecular utilizando el centro di-hierro de su sitio activo (Figura 4). El centro di-hierro es común a otras proteínas como metano monooxigenasas, ribonucleótido reductasas y otras oxidasas [104].

Introducción

Para la formación de un doble enlace se requieren dos electrones. Estos electrones son suplidos por dos sistemas de transporte de electrones funcionalmente equivalentes, uno en plastidios y otro en sistemas de endomembranas (como retículo endoplásmico). Estos sistemas son específicos de compartimientos subcelulares pero no de tipo de desaturasa. Durante la reacción de desaturación un par de electrones provenientes de NADPH o NADH son transferidos simultáneamente a una flavoproteína que actúa como reductora y los libera de a uno por vez hacia una proteína capaz de transportar solo un electrón. Dos moléculas reducidas de esta proteína transfieren luego los electrones de manera secuencial a la desaturasa para la catálisis. En el caso de las **acil-ACP desaturasas** la fuente de equivalentes de reducción es el **NADPH**, la flavoproteína es la **ferredoxina-NADP+ oxidoreductasa**, y el transportador de electrones es la proteína con centro 2Fe-2S, **ferredoxina** (Figura 4) [105-107]. Para las **Acil-CoA desaturasas** de retículo endoplásmico, los equivalentes de reducción son suministrados por el **NADH**, la flavoproteína es la **citocromo b_5 reductasa** y el transportador de electrones, la proteína hemínica **citocromo b_5** [108-110].

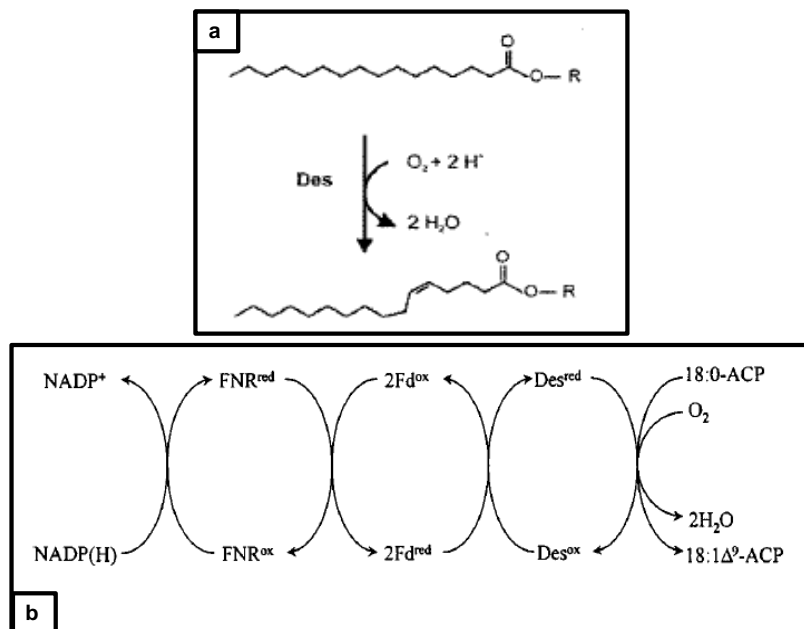


Figura 4. (a) Esquema de una reacción de desaturación dependiente de oxígeno. Se trata de una deshidrogenación dependiente de 2e^- y oxígeno molecular en una cadena acilada, que resulta en un doble enlace en posición *cis* [1]. (b) Cadena de transporte de electrones de una desaturasa Δ^9 -18:0-ACP. FNR: ferredoxina-NADP+ oxidoreductasa; Fd^{red} : Ferredoxina reducida; Fd^{ox} : Ferredoxina oxidada. Des^{red} : desaturasa reducida; Des^{ox} : desaturasa oxidada [44]

2.3. Regulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados en organismos que poseen desaturasas.

El estudio sobre la regulación de las acil desaturasas de diferentes organismos converge en dos conceptos importantes: a) que las propiedades físicas de las membranas pueden activar vías de transducción de señales que controlen la expresión de los genes de las desaturasas y b) que los AGI, producto de estas enzimas actúen como moléculas de señalización negativas que apaguen el sistema [55]. A continuación se describen los modelos regulatorios de tres organismos que poseen desaturasas: *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.1 Sistema DesK-DesR de *B. subtilis*

B. subtilis posee solo una desaturasa Des codificada por el gen *des* [111]. Esta desaturasa cataliza la introducción de un doble enlace *cis* en la posición $\Delta 5$ de un ácido graso saturado previamente esterificado a fosfolípidos de membrana. La transcripción de *des* aumenta en respuesta a un descenso en la temperatura [111, 112] y su expresión está regulada por un sistema de dos componentes canónico que consta de una histidin quinasa DesK y de un regulador de respuesta DesR [113]. DesK contiene cinco hélices transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal que contiene el dominio quinasa. Este dominio es capaz de autofosforilarse en una histidina conservada en posición 188 en respuesta a cambios en la fluidez de membrana [114]. Cuando incrementa la proporción de lípidos ordenados, ya sea por una disminución de temperatura o por crecimiento en medios pobres, se favorece el estado quinasa. La quinasa fosforilada transfiere el grupo fosfato al un aspartato en posición 54 del regulador DesR, lo que provoca un cambio conformacional del mismo que expone así el dominio de unión a ADN (HTH), permitiendo la interacción con el promotor de la desaturasa. Entonces, se recluta a la ARN polimerasa activando su transcripción y la síntesis de la $\Delta 5$ -desaturasa [115, 116].

2.3.2 Sistema OLE1 de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae, al igual que *B. subtilis* posee una única desaturasa, Ole1 que introduce dobles enlaces en posición $\Delta 9$ de ácidos grasos esterificados a CoA [117, 118]. Ole1 se localiza en el retículo endoplasmático (RE), donde se encuentra la mayor parte de la maquinaria de síntesis de lípidos. En esta organela se desaturan ácidos grasos lineales de 16 y 18 carbonos de longitud, originando como productos ácidos palmitoleico y oleico, respectivamente, que luego son distribuidos a las membranas de los sistemas celulares y comprenden más del 70% del total de ácidos grasos de la célula. El gen *ole1* se encuentra altamente regulado en respuesta a varias señales medioambientales. Su transcripción se activa a baja temperatura [118] y bajo condiciones de hipoxia [119]. Como la reacción de desaturación utiliza oxígeno como aceptor de electrones, la inducción de *ole1* bajo condiciones de hipoxia sería una respuesta a una falta de AGI en condiciones de limitación de sustratos [120, 121]. Se requieren además dos factores de transcripción para la transcripción de *ole1*: *SPT23* y *MGA2*. Spt23p y Mga2p se sintetizan inicialmente como precursores inactivos, anclados a la membrana del RE mediante un segmento transmembrana en el extremo C-terminal. Estos segmentos transmembrana son clivados por un proceso dependiente de ubiquitin/proteasoma y los dominios solubles N-terminales son transportados hacia el núcleo donde promueven la transcripción de *ole1* [122-124]. Bajo condiciones de crecimiento óptimas, mutantes únicas en ambos genes activan normalmente la transcripción de *ole1* [125, 126]. Sin embargo, MGA2 es esencial para tal fin bajo condiciones de hipoxia y descenso de la temperatura [120, 126]. Además, el procesamiento de Mga2p se induce durante una depleción de oxígeno [127]. Por otra parte la transcripción de *ole1* se reprime en presencia de AGI. El grado de inhibición aumenta con el descenso del punto de fusión del ácido graso agregado [128, 129]. Los AGI también incrementan la desestabilización del ARNm de *ole1* por un mecanismo que involucra la región 5' UTR del ARNm y que es mediado por el exosoma [130-132]. Es interesante remarcar que el clivaje de Spt23p and Mga2p y por lo tanto la generación de los correspondientes factores de transcripción activos, también se ve afectado por los AGI. En condiciones normales, la adición de AGI bloquea casi completamente el clivaje de Spt23p, mientras que el clivaje de Mga2p se ve menos afectado [122, 127].

2.3.3 Sistema DesA-DesB de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa posee la clásica vía anaeróbica de síntesis de AGI y además dos desaturasas dependientes de oxígeno para el mismo fin, DesA y DesB. DesA es homóloga en secuencia a las desaturasas de *B. subtilis* y *S. cerevisiae*, mientras que DesB solamente encuentra homología con la desaturasa DesA3 de *M. tuberculosis*. Además los genes adyacentes a ambas desaturasas codifican para óxidoreductasas, que se necesitan para el transporte de electrones durante la reacción de desaturación [133].

DesA es una desaturasa $\Delta 9$ de ácido palmítico que introduce el doble enlace en la cadena acilada esterificada en la posición 2 del glicerol de fosfatidiletanolamina. Por su parte, DesB funciona como una desaturasa de ácidos grasos exógenos, lo que queda demostrado porque el agregado de AGS de 16 y 18 carbonos de longitud al medio de cultivo de una doble mutante $\Delta fabA \Delta desA$, es suficiente para recuperar el crecimiento de la misma [133]. De esta manera se plantea que DesA complementa la vía FabA/FabB en condiciones de aerobiosis y le permite a la bacteria un mayor crecimiento. Por otra parte, en presencia tanto de oxígeno, como de AGS, la vía DesB también es funcional, aunque el crecimiento es menor en ausencia de las otras vías [63, 133].

En cuanto a la regulación de la síntesis de AGI en esta bacteria, corriente arriba de DesC (la óxidoreductasa de DesB) se codifica DesT un represor de la familia TetR, que tiene la capacidad de unirse a una secuencia palindrómica de ADN que se encuentra en los promotores de los operones *desBC* y *fabAB*, cuando se encuentra unido a acil-CoAs. La unión a acil-CoAs saturados e insaturados tiene la misma afinidad, pero cuando DesT se encuentra unido a un AGI-CoA, se une con mayor fuerza a sus respectivos promotores blanco, reprimiendo la transcripción de los mismos [70, 134]. Además DesT tiene una mayor afinidad por el promotor de *desBC* que de *fabAB*. La habilidad de DesT de sensar el *pool* de acil-CoA celular y ajustar la expresión génica en base a la proporción de AGI:AGS, proporciona un sistema elegante del balance en la producción de AGI por las dos vías disponibles [135].

2.4 Antecedentes sobre sistemas desaturantes en micobacterias.

Se han descrito en la bibliografía tres sistemas desaturantes en micobacterias, en *M. plhei* [136-138], en *M. smegmatis* [139] y en *M. tuberculosis* [140]. Estos trabajos tienen un enfoque

principalmente bioquímico que describe las características de los sistemas en general, focalizándose principalmente en la naturaleza de los productos obtenidos, en los cofactores necesarios para la reacción y en la localización subcelular de las enzimas que llevan a cabo dichas actividades desaturantes. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado enfoques genéticos, ni se ha trabajado con las desaturasas propiamente dichas.

En *M. plhei* se determinó en primera instancia que el ácido esteárico origina el ácido oleico y que este último da origen al ácido 10-metilesteárico o ácido tuberculosteárico [137]. Luego se demostró que esta especie posee una desaturasa que se localiza en la fracción de membranas y que utiliza como sustratos palmitoil-CoA y estearoil-CoA dando como productos los ácidos palmitoleico y oleico, respectivamente. De esto se deduce la regioselectividad de esta fracción enzimática como $\Delta 9$. Además en este mismo trabajo se determina la dependencia de la reacción de iones hierro y NADPH como donador de electrones [138]. Más tarde se reportó la presencia de una NADPH-citocromo *c* reductasa dependiente de FAD y un intermediario desconocido y sensible al cianuro [136].

En *M. smegmatis* se describió un sistema desaturante soluble compuesto por una desaturasa de ácidos grasos de cadena larga (principalmente 22C-24C) que introduce una insaturación en posición $\Delta 15$ de C24:0 en presencia de oxígeno molecular y NADPH. Además componen el sistema una oxidasa dependiente de NADPH y una ferredoxina. Este sistema e inhibe por FMN e iones hierro [139].

Por último, en *M. tuberculosis* se determinó que la proteína DesA3 es la responsable de la desaturación de los derivados de CoA de los ácidos palmítico y esteárico para dar como productos ácidos palmitoleico y oleico, respectivamente, siendo entonces una $\Delta 9$ palmitoil/estearoil-desaturasa. Esta enzima se localiza en la fracción de membranas y utiliza como óxido-reductasa la proteína codificada corriente arriba de la misma que es NADPH dependiente. Sin embargo, en este trabajo no se determina el donador de electrones [140].

Es interesante remarcar que existe un sesgo en cuanto a la regioselectividad determinada de las enzimas de los tres sistemas descriptos, debido a que se utilizan ácidos grasos puntuales en los ensayos de actividad enzimática, dejando abierta la posibilidad de que estas desaturasas sean capaces de introducir dobles enlaces en ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena de las descriptas.

3. OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL.

- Estudiar las vías de síntesis de ácidos grasos insaturados en *Mycobacterium smegmatis* mc²155 y *M. tuberculosis* y analizar el efecto de factores ambientales sobre las mismas.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar el efecto de los cambios de temperatura sobre el crecimiento de *M. smegmatis* mc²155.
- Evaluar el efecto de los cambios de temperatura sobre la composición lipídica de *M. smegmatis* mc²155.
- Analizar la expresión transcripcional de las regiones promotoras de los genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos insaturados.
- Elucidar la función biológica de los genes que codifican para desaturasas en el genoma de *M. smegmatis* mc²155 y relacionarlo con la desaturasa de *M. tuberculosis*.
- Evaluar el efecto de la droga isoxil sobre la fisiología de *M. smegmatis* mc²155.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo de tesis fueron *M. smegmatis* mc²155 y *M. tuberculosis* H37Rv. Para la manipulación de ADN y construcción de vectores se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, *hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺), λ ⁻).*

4.2 Medios de cultivo

Para el crecimiento de *M. smegmatis* mc²155 y sus cepas derivadas y *M. tuberculosis* H37Rv, se utilizó el medio Middlebrook 7H9 en tres variantes: 7H9-glicerol 0,5% v/v - ADS/OADS/PADS 10% v/v (albúmina, dextrosa, cloruro de sodio/ácido oleico, albúmina, dextrosa, cloruro de sodio/ácido palmitoleico, albúmina, dextrosa, cloruro de sodio) con o sin el agregado de agar 1,5%. También se utilizó el medio 7H9-Succinato de sodio 0,2%. Además se utilizó el tensioactivo Tritón WR 1339 (0.25 % v/v).

Para el crecimiento de *E. coli* DH5 α se utilizó medio Luria-Bertani.

Caldo Middlebrook 7H9, (composición en g/l)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
Na ₂ (HPO ₄)	2,50
K(H ₂ PO ₄)	1,00
Citrato de sodio	0,10
MgSO ₄	0,05
CaCl ₂	0,005
ZnSO ₄	0,001
CuSO ₄	0,001
Citrato férrico amónico	0,04

Acido l-glutámico	0,50
Piridoxina	0,001
Biotina	0,0005

ADS

Albúmina	5% p/v
Dextrosa	2% p/v
NaCl	0,81% p/v

OADS

Albúmina	5% p/v
Dextrosa	2% p/v
NaCl	0,81% p/v
Acido oleico	0,6% v/v

PADS

Albúmina	5% p/v
Dextrosa	2% p/v
NaCl	0,81% p/v
Acido palmitoleico	10% v/v

Preparación de um litro de medio 7H9 ADS sólido:

Agua destilada	890ml
----------------	-------

7H9	4,7g
ADS	100ml
Glicerol 50%	10ml
Agar	15g

El suplemento ADS es agregado al medio base previamente esterilizado por autoclavado.

Para preparar 7H9 OADS/PADS se reemplaza el ADS por OADS /PADS.

Medio líquido 7H9 ADS Glicerol Tritón WR1339 (7H9 ADS-G-T) (composición por litro):

Agua destilada	890ml
7H9	4,7g
ADS	100ml
Glicerol 50% v/v	10ml
Tritón WR1339 25%	1ml

Los medios suplementados con ADS/OADS/PADS, glicerol y tritón se denominan: 7H9-ADS-G-T, 7H9-OADS-G-T y 7H9-PADS-G-T, respectivamente.

Medio líquido 7H9 Succinato Tritón WR1339 (7H9-Succ-T) (composición por litro):

Agua destilada	890ml
7H9	4,7g
Succinato de Na 20% (v/v)	100ml
Tritón WR1339 25%	1ml

Luria-Bertani (LB)

Agua destilada	1000ml
NaCl	10g
Extracto de levadura	5g
Triptona	10g

Medio GYT

Agua destilada	900ml
Glicerol	100ml
Extracto de levadura	1,25g
Triptona	2,5g

4.3 Antimicrobianos

Se utilizaron los antibióticos Kanamicina (20 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155 y 50 µg/mL para *E. coli* DH5α), Ampicilina (100 µg/mL para *E. coli* DH5α), Higromicina (50 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155 y 150 µg/mL para *E. coli* DH5α), Espectinomicina (100 µg/mL para *E. coli* DH5α), Estreptomicina (20 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155), Isoxil (10, 20, 50, 100 y 200 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155), Rifampicina (16, 32, 64, 128, 256 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155), Cristal Violeta (4, 8, 16, 32, 64 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155), Novobiocina (32, 64, 128, 256, 512 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155) y Tiacetazona (10, 20, 50, 100 y 200 µg/mL para *M. smegmatis* mc²155).

4.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM₉₉)

La CIM₉₉, cantidad mínima de droga que inhibe el crecimiento del 99% del inóculo sembrado, fue determinada sembrando una dilución (equivalente a 10³ células aproximadamente) de cultivos saturados de las distintas cepas crecidos a 37°C, en medio sólido 7H9-ADS sin antibióticos o suplementado con concentraciones crecientes de los antibióticos en estudio. Los resultados fueron leídos luego de incubar las placas por 5-7 días.

4.5 Vectores de clonado y expresión

Para el clonado de genes se utilizó el plásmido pCR®-Blunt II-TOPO® (inVitrogen).

Para la determinación de actividad promotora se utilizó el vector lanzadera pSM128 que tiene un gen de resistencia a espectinomicina que permite su selección en *E. coli* y uno de resistencia a estreptomicina que permite lo propio en *M. smegmatis*. Además este vector posee el gen *lacZ* corriente abajo del sitio de clonado, lo que permite que este gen se exprese bajo el control del promotor en estudio. Su expresión se mide mediante un ensayo de actividad β-galactosidasa.

Para la construcción de la cepa delecional en *MSMEG_1886* se utilizó el sistema de “*recombineering*” [141] que consiste en la recombinación de un fragmento de ADN lineal (que contiene dos regiones homólogas al cromosoma y un *cassette* de resistencia a higromicina) en la zona del cromosoma de *M. smegmatis* donde haya homología, mediante las proteínas de recombinación gp60 y gp61 del micobacteriofago Che9c. Estas proteínas se encuentran codificadas en el plásmido pJV53, cuya expresión es regulada por acetamida. El vector utilizado para la construcción del fragmento de recombinación fue pLITMUS 28.G (New England BioLabs® Inc.). El *cassette* de higromicina utilizado para esta construcción fue extraído por corte con enzimas de restricción del plásmido pHp45Ω.

Los genes de las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155 fueron expresados en el vector pLAM12 [141]. Este plásmido permite clonar genes bajo el control de un promotor inducible por acetamida y posee un *cassette* de resistencia a kanamicina que permite su selección.

Para la construcción de los ARNm antisentido de las desaturasas de *M. smegmatis*, se utilizó el vector replicativo pML2031[142]. Este vector posee un promotor inducible por nitrilos y dos *cassettes* de resistencia antibiótica, uno de higromicina y uno de kanamicina.

Plásmido	Características relevantes	Fuente
pCR®-Blunt II-TOPO®	Vector de clonado	inVitrogen
pLITMUS G.28	Vector de clonado	NEB
pSM128	Vector lanzadera. Contiene el gen LacZ. Serie pJEM	[143].
pSMP1886	pSM128 con región promotora de <i>MSMEG</i> _1886	Esta tesis
pSMP1885	pSM128 con región promotora de <i>MSMEG</i> _1885	Esta tesis
pPSMP1211	pSM128 con región promotora de <i>MSMEG</i> _1211	Esta tesis
pSMP1742	pSM128 con región promotora de <i>MSMEG</i> _1742	Esta tesis
pSMP1743	pSM128 con región promotora de <i>MSMEG</i> _1743	Esta tesis
pSMP6835	pSM128 con región promotora de <i>MSMEG</i> _6835	Esta tesis
pSMP6836	pSM128 con región promotora de <i>MSMEG</i> _6836	Esta tesis
pJV53	Contiene las proteínas recombinogénicas del fago Che9 (gp60-gp61) bajo el control del promotor acetamidasa.	[144]
pHP45Ω	Contiene el cassette de higromicina de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> Ver especie	[145]
pLITA1886	pLITMUS G.28 con fragmento de <i>recombineering</i> para delecionar <i>MSMEG</i> _1886	Esta tesis
pMV306::1886	Vector de expresión de micobacterias conteniendo una copia del gen <i>MSMEG</i> _1886	Esta tesis
pLAM12	Vector de expresión de micobacterias. Contiene el promotor acetamidasa	[144]
pLAM1211	pLAM12 con <i>MSMEG</i> _1211 para sobreexpresión	Esta tesis
pLAM1743	pLAM12 con <i>MSMEG</i> _1743 para sobreexpresión	Esta tesis
pLAM6835	pLAM12 con <i>MSMEG</i> _6835 para sobreexpresión	Esta tesis
pML2031	Vector de expresión de micobacterias. Contiene un promotor inducible por nitrilos.	[142]
pML1211AS	pML2031 con ARNm antisentido de <i>MSMEG</i> _1211	Esta tesis
pML1743AS	pML2031 con ARNm antisentido de <i>MSMEG</i> _1743	Esta tesis

4.6 Oligonucleótidos cebadores utilizados

Nombre	Descripción	Sitio de corte	Secuencia
P1211 For	Región promotora <i>MSMEG</i> _1211	ScaI	<u>AGTACT</u> CAACCTGATGTCGGCGCCGTTTC
P1211 Rev	Región promotora <i>MSMEG</i> _1211	ScaI	<u>AGTACT</u> GGGGGTCAATTTTCGCGTATACCGC
P1886 For	Región promotora <i>MSMEG</i> _1886	ScaI	<u>AGTACT</u> TTGCCGACGAGGTTCCCGACTG
P1886 Rev	Región promotora <i>MSMEG</i> _1886	ScaI	<u>AGTACT</u> AGCCATTGGCAACCCTCCTTTC
P1742 For	Región promotora <i>MSMEG</i> _1742	ScaI	<u>AGTACT</u> GTACCGCAGCGCCGAGG
P1742 Rev	Región promotora <i>MSMEG</i> _1742	ScaI	<u>AGTACT</u> AATCCGGCGGCGGTCTGTT
P1743 For	Región promotora <i>MSMEG</i> _1743	ScaI	<u>AGTACT</u> CTTCGTGCACAGGCGTTCA
P1743 Rev	Región promotora <i>MSMEG</i> _1743	ScaI	<u>AGTACT</u> TAGGTGGGTGTACTCATCAG
P6835 For	Región promotora <i>MSMEG</i> _6835	ScaI	<u>AGTACT</u> GTAGGCGTGGCTCACAAC
P6835 Rev	Región promotora <i>MSMEG</i> _6835	ScaI	<u>AGTACT</u> GTGCCGTGATGACCATGAG
P6836 For	Región promotora <i>MSMEG</i> _6836	ScaI	<u>AGTACT</u> TTGTGCGCAGGCATTCC

P6836 Rev	Región promotora <i>MSMEG_6836</i>	ScaI	<u>AGTACT</u> AGTTGTGAGCCACGCCTAC
1886 For Up	Mutante delecional <i>MSMEG_1886</i> fragmento 5'	XbaI	<u>TCTAGAT</u> TGGAAGGCCGCGGTGTGGGCGAG
1886 Rev Up	Mutante delecional <i>MSMEG_1886</i> fragmento 5'	BamHI	<u>GGATCCT</u> CCTGACGGATCGCGTCCAGCTCG
1886 For Dn	Mutante delecional <i>MSMEG_1886</i> fragmento 3'	BamHI	<u>GGATCCCA</u> AGTCGACCGCCAAGGCCAACGCG
1886 Rev Dn	Mutante delecional <i>MSMEG_1886</i> fragmento 3'	EcoRI	<u>GAATTC</u> GAGAAACCAGGCGTACCTAGGCGGC
Hig Rev	Chequeo mutación delecional. Hibrida dentro del <i>cassette</i> de Hig		GCGGTCGGGATCGCCAATCTCTACG
1211 For	Sobreexpresión de <i>MSMEG_1211</i>	BamHI	GAACCGGGATCCAGGTGGCAATC
1211 Rev	Sobreexpresión de <i>MSMEG_1211</i>	EcoRI	CCGG <u>ACTTAAG</u> CTAGCGCCGAAAGATT
1743 For	Sobreexpresión de <i>MSMEG_1743</i>	PstI	<u>CTGCAGAT</u> GAGTACACCCACCTACAC
1743 Rev	Sobreexpresión de <i>MSMEG_1743</i>	HindIII	<u>AAGCTT</u> TCAGTGCGCCAGTGCCAG
6835 For	Sobreexpresión de <i>MSMEG_6835</i>	PstI	GATCCTC <u>CTGCAG</u> ATGGTCATCACGG
6835 Rev	Sobreexpresión de <i>MSMEG_6835</i>	HindIII	TCAGCGG <u>AAGCTT</u> CTCAGTCGTTC
1211 AS For	Para generar ARNm antisentido de <i>MSMEG_1211</i>	NdeI	<u>CATATG</u> CTAGCGCCGAAAGATTCCG
1211 AS Rev	Para generar ARNm antisentido de <i>MSMEG_1211</i>	EcoRV/ BamHI	<u>GATATC/GGATCC</u> ACAGACCGGAATCCAGGTG
1743 AS For	Para generar ARNm antisentido de <i>MSMEG_1743</i>	NdeI	<u>CATATG</u> TCAGTGCGCCAGTGCCAG
1743 AS Rev	Para generar ARNm antisentido de <i>MSMEG_1743</i>	EcoRV/ BamHI	<u>GATATC/GGATCC</u> CTGATGAGTACACCCACCTA
6835 AS For	Para generar ARNm antisentido de <i>MSMEG_6835</i>	NdeI	<u>CATATG</u> TCAGTCGTTCCCGCGCGG
6835 AS Rev	Para generar ARNm antisentido de <i>MSMEG_6835</i>	PacI/ BamHI	<u>TTAATTAAAGGGATCCT</u> CATGGTCATCA
RT-1211/1743 For	RT-PCR región codificante de 1211 y 1743		ATCGAGCACCACTGTACC
RT-1211 Rev	RT-PCR región codificante de 1211		GTGTGAAGATGATCCGCAG
RT-1743 Rev	RT-PCR región codificante de 1743		GCCAGCCGCACGATCTTG

4.7 Extracción de ADN para Reacción en Cadena de la Polimerasa

El ADN de las micobacterias se obtuvo mediante el protocolo descrito por Madiraju [146]:

Se toman colonias de una placa y se pasan a un tubo de microcentrífuga con tapa O-ring que contiene 100µL de Tris-EDTA pH=8. Se agregan bolitas de Zirconio de 100 µm hasta que quede una película de Tris-EDTA sobre las mismas. A continuación:

- Se agita mecánicamente 1min
- Se incuba en hielo 1min

- Se agita mecánicamente 1min
- Se incuba en hielo 1min
- Se incuba a 95°C 10min
- Se centrifuga a 12.000 rpm 2min
- Se agita mecánicamente 1min
- Se incuba en hielo 1min
- Se centrifuga a 12.000 rpm 2min
- Se traspasa el sobrenadante a tubo eppendorf y se utiliza 1μL para 50μL de mezcla de PCR

4.8 Electroporación de *E. coli*

Se inoculan 25 mL de LB con una colonia de *E. coli*. Se incuba toda la noche a 37°C y se diluye en 500 mL de LB. Se deja llegar el cultivo a DO_{600nm} de 0,35-0,4 y se incuba en hielo por 15 minutos. A partir de aquí todas las centrifugaciones se realizan a 4°C y las soluciones utilizadas se incuban previamente en hielo. Las células se centrifugan 15 min a 1000 g, se resuspenden en agua, se centrifugan 20 min a 1000x g, se resuspenden en 250 mL de glicerol 10%, se centrifugan 20 min a 1000x g, se resuspenden en 10 ml de glicerol 10%, se centrifugan 20 min a 1000x g y se resuspenden en 1ml de medio GYT frío. Se mide la DO_{600nm} de una dilución 1 en 100 y se lleva a una DO=80-120 en caso de ser necesario. Se guardan alícuotas de 40μL a -20°C para su posterior utilización.

Para la transformación se utilizan cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad), previamente enfriadas, donde se incuban las células con 10 a 100 ng de ADN en un volumen de 2μL. La electroporación se lleva a cabo en un electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad), fijando el pulso programado EC2 (2,5 kV). Se recuperan agregando 1ml de LB e incubando a 37°C por 1h, luego de lo cual se siembran 100 μL en placas de LB agar con el antibiótico correspondiente.

4.9 Electroporación de *M. smegmatis*

Se crecen cultivos de 20 ml de *M. smegmatis* mc²155 en medio 7H9-ADS-G-T a 37°C. Una vez alcanzada una DO_{600nm} de 0,5-1 se centrifuga el cultivo 15 min a 2000x g y se lava 3 veces con una solución de glicerol 10% (v/v) a 4°C. El precipitado es resuspendido en 800 μL de glicerol 10% (v/v), se agrega el ADN y se incuba a 4°C por 10 min. Se colocan las células en cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) y se les da un pulso de 2,5V y 25μF, con una resistencia de 1000Ω. Se agrega inmediatamente 1ml de medio 7H9-ADS-G-T, se traspasa a un tubo de 15 ml y

se deja incubando con agitación por 2 hs a 37°C. Se centrifuga, se resuspende el pellet en 100µL de medio y se siembra en placas de 7H9 ADS Glicerol con los antibióticos correspondientes. Las placas se incuban a 37°C por 3-5 días.

4.10 MANIPULACION DE ADN

4.10.1 Preparación de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó según el siguiente protocolo de lisis alcalina [147]

Se inocula una colonia de *E. coli* en 2,5 mL de medio LB en un tubo de 15 ml con el antibiótico adecuado. Se incuba toda la noche a 37°C con agitación, se toman 2 mL de la suspensión en un tubo eppendorf y se centrifuga a 12500 rpm por 1 minuto. Se remueve el sobrenadante y se centrifuga a la misma velocidad por 2 segundos, descartando el exceso de líquido. Se resuspende el pellet en 200 µL de buffer de lisis (50mM glucosa, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA y lisozima 5 mg/mL), se agita mecánicamente por 5 segundos y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregan 400 µL de solución alcalina fresca (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcla por inversión 5 veces y se coloca el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se agregan 300 µL de acetato de amonio 7.5M frío (pH 7.6) a la solución anterior, se mezcla por inversión suave 5 veces y se coloca el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifuga la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf. Se agregan 0,6 volúmenes de isopropanol y se incuba a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifuga la mezcla 12500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. Se agregan 100 µL de acetato de amonio 2M (pH 7,4) al pellet, se agita mecánicamente y se incuba en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifuga la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se separa el sobrenadante. Se agregan 100 µL de isopropanol y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifuga la mezcla 12500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. Se lava el pellet con etanol 70%. Se remueve el etanol por centrifugación y se deja secar el pellet. Finalmente, se disuelve el pellet en 50 µL de agua destilada.

4.10.2 Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasa alcalinas

Las condiciones generales para los tratamientos de ADN con enzimas de restricción, fosfatasa alcalina y reacciones de ligación con T4 DN ligasa fueron realizadas mediante métodos convencionales según Sambrook [148], y según las recomendaciones de los manuales de los laboratorios proveedores de las enzimas utilizadas.

4.10.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN de plásmidos y de fragmentos amplificados por PCR fue realizada en el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, ME, USA. El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa SeqManII (DNASTAR Inc.).

4.10.4 Purificación de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN obtenidos de las digestiones enzimáticas y de las reacciones de PCR fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.10.5 Clonado de genes

Para el clonado de genes se utilizó en todos los casos la misma estrategia: se utilizaron oligonucleótidos sintéticos (que poseen sitios de restricción para clonar en el sitio de múltiple clonado de los plásmidos adecuados) en una reacción de PCR. La mezcla de reacción de PCR contenía:

H ₂ O miliQ	37,5 µL
Buffer 10X	5 µL
dNTPs (10mM c/u)	1,5 µL

DMSO	2,5 μ L
Oligo Fw (20 μ M)	1 μ L
Oligo Rv (20 μ M)	1 μ L
ADN cromosomal	1 μ L
Pfx ADN polimerasa (Invitrogen)	0,5 μ L

Las mezclas fueron sometidas a desnaturalización (94°C, 1 min), seguido de 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), anillado (58°C, 30 seg) y extensión (68°C, 1 a 2 min de acuerdo a la longitud del fragmento a amplificar).

Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (0,8% p/v). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen) y el inserto clonado fue confirmado por análisis de restricción y secuenciación.

4.11 Curvas de crecimiento

El análisis del crecimiento de las cepas se realizó utilizando cultivos crecidos en medio líquido 7H9ADS-G-T a 37°C (con el agregado del antibiótico correspondiente cuando fue necesario). Cultivos saturados de las cepas en estudio fueron utilizados para inocular medio fresco e incubadas a la temperatura adecuada hasta una DO_{600} inicial = 0,1-0,2; en este punto se tomaron alícuotas de los cultivos a distintos tiempos y se determinó la DO_{600} . Las temperaturas ensayadas fueron: 25, 37 y 42°C.

Se realizaron además curvas de crecimiento en presencia de los inductores acetamida e isovaleronitrilo (IVN). En el primer caso se utilizó el medio 7H9-Succ-T-Kan. Para el segundo inductor se utilizó el medio 7H9-ADS-G-T-Kan/Hig. Cultivos saturados de las cepas en estudio fueron utilizados para inocular el medio fresco correspondiente e y se incubaron a 37°C hasta una DO_{600nm} inicial = 0,1-0,2; en este punto se agregó el inductor correspondiente (acetamida a 0,2% v/v e IVN 1 μ M). Se tomaron alícuotas de los cultivos a distintos tiempos y se determinó la DO_{600nm} .

4.12 Análisis de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos

La síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos fue analizada en las distintas cepas mediante dos metodologías: 1) incorporación del precursor radiactivo ácido $[1-^{14}\text{C}]$ acético en dichas macromoléculas seguido de su extracción, separación por Cromatografía en Capa Delgada (TLC) y detección por autoradiografía y 2) identificación y cuantificación de los ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para ello, cultivos de *M. smegmatis* fueron crecidos en 7H9 ADS-G-T hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$ a 37°C . En este punto se dividieron los cultivos en alícuotas que fueron incubadas a la temperatura correspondiente por 30 minutos, luego se agregó ácido $[1-^{14}\text{C}]$ acético y se continuó la incubación por 3 h a cada temperatura ensayada. En el caso de los cultivos analizados por GC-MS no se agregó el precursor radiactivo y se incubaron por el mismo tiempo. Luego de la incubación el procedimiento fue el mismo para los dos tipos de cultivos: las células fueron colectadas por centrifugación, lavadas dos veces con agua y sometidas a hidrólisis alcalina con hidróxido de tetrabutilamonio (TBAH, Aldrich) al 15% (v/v) a 100°C por 12hs. Posteriormente se adicionaron 2ml de CH_2Cl_2 y $100\mu\text{L}$ de CH_3I a cada tubo, mezclándose los mismos por rotación a temperatura ambiente por 1h. Los metil-ésteres así formados fueron obtenidos mediante separación de las fases acuosa y orgánica por centrifugación a baja velocidad. La fase orgánica fue recuperada y secada a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno luego de lo cual se resuspendió en 2 mL de éter etílico. Se dejó decantar por precipitación los restos sólidos presentes en la muestra y el sobrenadante, conteniendo los metil ésteres de ácidos grasos y ácidos micólicos (FAMEs y MAMEs, de sus siglas en inglés), se traspasó a otro tubo y se secó a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno.

Los MAMEs y FAMEs fueron separados por cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando sílica G 60 como soporte. Para la TLC mono-dimensional se utilizó éter de petróleo:éter etílico (85:15 v/v) como fase móvil. Las muestras (aprox. 40.000 cpm) fueron sembradas y desarrolladas tres veces en este sistema. Para las TLC mono-dimensionales con Ag^+ se impregnaron las placas con una solución de AgNO_3 10% p/v y se utilizó el mismo sistema de solventes. Para la TLC bidimensional las muestras (aprox. 100.000 cpm) fueron sembradas en placas de sílica previamente tratadas con una solución de AgNO_3 10% p/v y desarrolladas dos veces en hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primer dirección y tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) en la segunda dirección. En ambos casos la radioactividad presente fue evidenciada por autoradiografía a -80°C en placas X-OMAT (Kodak). Para la identificación y cuantificación de ácidos grasos, los MAMEs y FAMEs fueron analizados por GC-MS en un cromatógrafo de gases Shimadzu GCMS QP2010 Plus. Se utilizó una columna capilar (30 m de largo x 0,25 mm de

diámetro interno x 0,25 μm de espesor de fase estacionaria) SPB-1(Supelco), 100% polidimetilsiloxano. Se utilizó helio a 1 ml min⁻¹ como gas de corrida y se programó la temperatura de la columna para subir de a 5°C min⁻¹ desde 160 a 320°C. Los resultados fueron analizados mediante el programa GCMS Postrun Analysis.

La posición de los dobles enlaces en los AGI se determinó mediante GC-MS. Los MEAGs fueron convertidos en aductos de dimetil-disulfuro (DMDS) por adición de 4mg de Iodo en escamas y 0,3 mL de DMDS. Se incubaron por 30 min a 35°C. Se le adiciona 1 mL de Hexano:Éter (1:1) y 1 mL de tiosulfato de sodio al 10%. Las mezclas se centrifugaron 5 min a 12000 xg. Los sobrenadantes fueron secados bajo atmósfera de nitrógeno y luego resuspendidos en 0,5 mL de hexano para su análisis.

La extracción de ácidos grasos totales se realizó mediante tres incubaciones sucesivas de 16 hs con metanol: cloroformo (2:1, 1:1 y 1:2, respectivamente), de los *pellets* de células de las cepas de *M. smegmatis* mc²155, UNRA1886 y UNRA1886C, crecidas en medio 7H9-ADS-G-T a 37°C hasta una DO₆₀₀=1. Los extractos fueron evaporados a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. Los lípidos obtenidos fueron resuspendidos en cloroformo y se sembraron 10 μL de una concentración 25 mg/mL en placas de sílica G. Se corrieron una vez en una mezcla de cloroformo:metanol (9:1) y se revelaron con α -naftol en H₂SO₄.

4.13 Determinación de actividad β -galactosidasa

Para la determinación de actividad β -galactosidasa, se siguió el protocolo descrito por Miller [149] con algunas modificaciones. Brevemente, se crecieron cultivos de *M. smegmatis* conteniendo el plásmido pMS128 vacío o con las regiones promotoras de los genes *MSMEG_1211*, *MSMEG_1885*, *MSMEG_1886*, *MSMEG_1742*, *MSMEG_1743*, *MSMEG_6835* y *MSMEG_6836* (pSM1211, pSM1885, pSM1886, pSM1742, pSM1743, pSM6835 y pSM6836, respectivamente) en medio 7H9 ADS-G-T a 37°C hasta una DO₆₀₀ = 0,5. En este punto los cultivos se dividieron en fracciones que fueron incubadas a 25, y 37°C. Se tomaron alícuotas de 3 mL cada 30 minutos hasta las 3 horas y luego una alícuota final a las 6 horas de crecimiento. Estas alícuotas fueron centrifugadas a 12000 rpm por 2 min y guardadas a -20°C hasta su análisis o usadas inmediatamente. Para ello Se resuspendieron en 800 μL Buffer Z (0.06 M Na₂HPO₄, 0.04 M NaH₂PO₄, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄, 0.005 M β -mercaptoetanol), se rompieron en un disruptor de células FastPrep[®]-24 de MP Biomedicals (Modelo #6004-500), mediante dos pulsos de

40 seg a 6,5 m/seg y se centrifugaron por 10 min a 19.000 rpm a 4°C. Se trabajó con los sobrenadantes a los que se les determinó concentración proteica mediante el método de Bradford [150], midiendo la absorbancia a 595 nm en microplaca. La actividad β -galactosidasa se determinó de la siguiente manera:

Una alícuota de extracto se llevó a volumen final de 800 μ L con buffer Z + β - mercaptoetanol.

- Se incubó 5 min en baño de agua a 28°C.
- Se adicionaron 100 μ L de ONPG (4 mg/mL) y se mezcló por inversión para mezclar la suspensión.
- Se incubó a 28°C por 10 min.
- Se detuvo la reacción por adición de 250 μ L de Na_2CO_3 1 M.
- Se tomaron 200 μ L de cada tubo y se traspasaron a una microplaca. Se midió la absorbancia a 420 nm.

La actividad β -galactosidasa fue expresada en Unidades Miller (nmol ONPG / mg prot * tiempo = U / mg prot).

4.14 Construcción de una mutante delecional en el gen *MSMEG_1886*

La construcción de la mutante delecional en el gen *MSMEG_1886* se llevó a cabo mediante la técnica denominada “*recombineering*”. Esta técnica consiste en la recombinación de un fragmento de ADN lineal en una zona del cromosoma donde exista homología con ese fragmento construido, asistida por las proteínas de recombinación gp60 y gp61 del fago Che9, que se encuentran codificadas en el vector pJV53. El uso de estas proteínas aumenta la eficiencia de recombinación y además reduce la posibilidad de recombinaciones ilegítimas en otras zonas del genoma distintas a la de interés [141].

Para la construcción del fragmento recombinogénico se amplificaron por PCR dos regiones de aproximadamente 500 pares de bases (pb), una corriente arriba y una corriente abajo del gen a delecionar. Estas regiones contienen 100 pb del gen para favorecer la recombinación específica y evitar posibles efectos polares. Una vez amplificadas, clonadas en pCR®-Blunt II-TOPO® y

secuenciadas, se sub-clonaron secuencialmente en el vector pLITMUS G.28 y se clonó en medio de los dos fragmentos un *cassette* de resistencia a higromicina que se obtuvo por corte con enzimas de restricción del vector pHP45Ω. Con el fragmento final que se obtuvo por restricción desde pLITMUS G.28, se transformó una cepa de *M. smegmatis* mc²155 (previamente transformada con el vector pJV53). Esta cepa se creció en medio de inducción 7H9-Succ-T-Kan hasta una DO₆₀₀= 0,4-0,5, punto en el que se agregó el inductor acetamida (0,2% v/v) para lograr la expresión de las proteínas gp60-gp61 y se incubó por 3 horas. Se prepararon células competentes como se mencionó anteriormente en esta sección y se transformaron con 100 ng del fragmento a recombinar. Se recuperaron las células en medio 7H9-G-OADS-Trit por 3 hs a 37°C y se sembraron en placas conteniendo medio sólidos 7H9-G-OADS-Hyg-Kan. Las transformantes obtenidas fueron analizadas por PCR con un oligonucleótido que hibrida dentro del *cassette* de higromicina y uno que hibrida por fuera de la zona de recombinación. Las mutantes obtenidas se utilizaron para estudios posteriores.

4.15 Sobreexpresión de las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155

Para la sobreexpresión de las desaturasas codificadas por los genes *MSMEG_1211*, *MSMEG_1743* y *MSMEG_6835* se amplificaron por PCR las regiones codificantes de cada uno de ellos y fueron clonadas en el vector pLAM12. Los vectores así obtenidos fueron denominados pLAM1211, pLAM1743 y pLAM6835. Se transformaron las cepas mc²155 y UNRA1886 con estos vectores y con el vector vacío y se seleccionaron en medio sólido 7H9-ADS-G-Kan. Cultivos saturados de las cepas en estudio fueron utilizados para inocular el medio 7H9-Succ-T-Kan y se incubaron a 37°C hasta una DO_{600nm} inicial = 0,1-0,2; en este punto se agregó el inductor acetamida a 0,2% v/v. Se tomaron alícuotas de los cultivos a distintos tiempos y se determinó la DO_{600nm}

4.16 Construcción de ARNm antisentido.

Para la construcción de los ARNm antisentido de los genes de las desaturasas de *M. smegmatis* (*MSMEG_1211*, *MSMEG_1743* y *MSMEG_6835*) se amplificaron por PCR las regiones codificantes de cada una de ellas y se clonaron en sentido opuesto al de codificación en el vector pML2031. Los clones transformantes obtenidos fueron chequeados por PCR y secuenciación y cultivos de éstos fueron crecidos a 25, 37 y 42°C hasta una DO₆₀₀= 0,5. En este punto se agregó el inductor Isovaleronitrilo (IVN) (1μM) para lograr la expresión de los ARNm antisentido y se

incubaron los cultivos a las temperaturas indicadas. En este punto se realizaron dos tipos de análisis: efecto de la expresión de los ARNm antisentido sobre el crecimiento (se tomaron puntos cada 3 horas y se determinó la DO_{600}) y sobre la síntesis de ácidos grasos mediante GC-MS en las cepas *M. smegmatis* mc²155 y UNRΔ1886 (se crecieron los cultivos por 16 hs en presencia o ausencia de IVN). Para confirmar el silenciamiento de los genes por sus respectivos ARNm antisentido, se realizó una retro-transcripción de los ARN totales de cada cepa, seguida de una PCR con oligonucleótidos que hibridan en la zona codificante de cada gen (RT-PCR).

4.17 Extracción de ARN total

Se crecieron cultivos de las cepas *M. smegmatis* mc²155 y UNRΔ1886 transformadas con los vectores pML2031, pML1211AS, pML1743AS y pML6835AS (este último solo se transformó en la cepa mc²155) en presencia o ausencia del inductor IVN a 37°C O/N, como se mencionó en el apartado anterior. Se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron los pellets en 500 µl de Tris-EDTA, 50 µl de SDS (10% v/v) y 500 µl fenol:cloroformo (1:1). Se les agregó 50 µl de bolitas de zirconio y se rompieron en el disruptor de células FastPrep[®]-24 de MP Biomedicals (Modelo #6004-500), mediante dos pulsos de 40 seg a 6,5 m/seg. Se centrifugaron los tubos 15min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. Se realizó una segunda extracción con fenol:cloroformo (1:1) de la fracción conteniendo el ARN y luego dos lavados con igual volumen de cloroformo. Se les adicionó 1/10 volumen de acetato de sodio 3M y 3 volúmenes de etanol absoluto y fueron almacenados a -20°C O/N. Se centrifugaron los tubos por 20 min a 4°C, se descartaron los sobrenadantes, se lavaron los pellets con etanol 70% (v/v), se secaron y se resuspendieron en agua libre de nucleasas. Los ARN así obtenidos fueron medidos por absorbancia a 260 y 280 nm para determinar la concentración y pureza, respectivamente. Los ARNs fueron tratados con ADNasa libre de ARN, RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101) (Promega[®]) siguiendo las especificaciones del fabricante.

4.18 Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)

1 µg de ARN total fue utilizado para su transcripción reversa mediante el *kit* Transcriptor First Strand cDNA System versión 6.0 (Roche[®]), siguiendo las especificaciones del fabricante. 4 µl del cADN obtenido fue utilizado para determinar, mediante PCR, los niveles de expresión de cada

desaturasa en presencia o ausencia de su respectivo ARNm antisentido. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

H ₂ O miliQ	11,5 µL
Buffer 10X	2 µL
dNTPs (10mM c/u)	0,4 µL
DMSO	0,5 µL
Oligo Fw (20µM)	0,4 µL
Oligo Rv (20µM)	0,4 µL
ADNc	4 µL
Pfx ADN polimerasa (Invitrogen)	0,2 µL

Las mezclas fueron sometidas a desnaturalización (94°C, 5 min), seguido de 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), anillado (56°C 40 seg) y extensión (68°C, 40 seg).

5. CAPÍTULO I

5.1 Efecto de la temperatura sobre la síntesis de ácidos grasos en *M. smegmatis* mc²155

5.1.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *M. smegmatis* mc²155.

Para evaluar el comportamiento de *M. smegmatis* mc²155 frente a los cambios de temperatura de crecimiento se realizaron curvas en medio de cultivo líquido 7H9 ADS-G-T a diferentes temperaturas (25, 30, 37 y 42°C) (Figura 5).

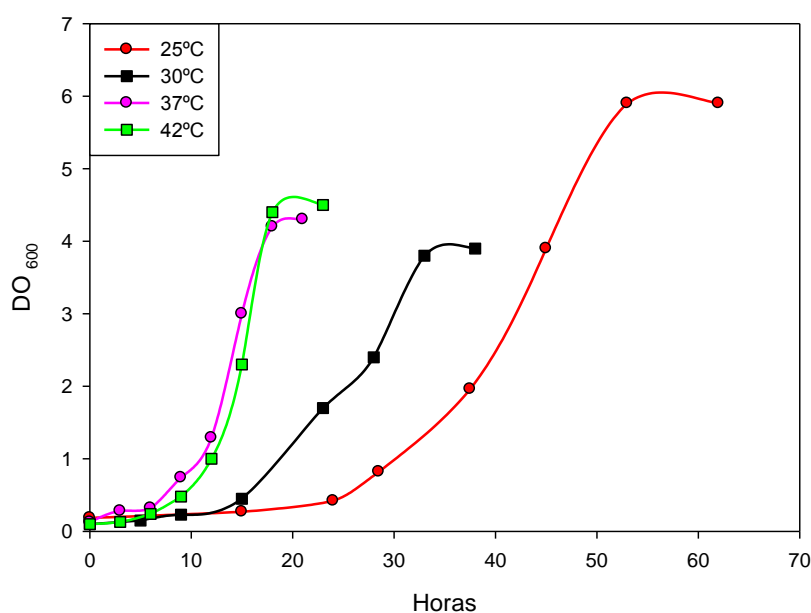


Figura 5. Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* mc²155. Se crecieron cultivos de *M. smegmatis* mc²155 en medio 7H9-ADS-G-T a 25, 30, 37 y 42°C. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se determinó la DO₆₀₀. Los valores representan un promedio de tres repeticiones independientes.

Como se aprecia en la figura 5, la velocidad de crecimiento se ve marcadamente afectada según la temperatura ensayada. Los tiempos de duplicación obtenidos fueron de 8 horas a 25°C, 5

horas a 30°C y 3 horas a 37 y 42°C. En base a este resultado es posible definir un rango de temperatura de crecimiento óptimo para *M. smegmatis* mc²155 que se encuentra entre los 37 y los 42°C. Así mismo, el desarrollo de colonias visibles en medio sólido varía entre los 3 días a 37 y 42°C, 5 días a 30°C y 7 días a 25°C.

5.1.2 Efecto de la temperatura sobre la composición lipídica de *M. smegmatis* mc²155.

Para evaluar el efecto de los cambios de temperatura sobre la composición de lípidos de *M. smegmatis* mc²155, se siguieron dos metodologías. Por un lado se estudió la síntesis de lípidos *de novo* a través de la incorporación del precursor ácido 1-[C¹⁴] acético en cultivos líquidos a distintas temperaturas. Se extrajeron los MEAGs y MEAMs como se describe en Materiales y Métodos y se resolvieron en una TLC en dos dimensiones (2D). Por otra parte se realizó el mismo procedimiento de crecimiento y extracción lipídica pero sin el agregado del precursor radiactivo, para analizar la composición lipídica total. Los extractos así obtenidos fueron analizados por GC-MS.

En la figura 6 (a) se observa una TLC 2D en la que se realizaron corridas en dos dimensiones. En la primera dimensión los lípidos se separan en función de su polaridad de acuerdo al sistema de solventes que se utilice. En la segunda dimensión, los lípidos corren en presencia del ion Ag⁺ que se une a los dobles enlaces y retrasa su corrida. Por lo tanto se separan en función de su polaridad, pero también en función de la presencia de dobles enlaces. De esta manera se logra una definición mayor que en una TLC en una dimensión. En la figura, se observa el perfil de lípidos de *M. smegmatis* a 25, 30, 37 y 42°C. Como se aprecia, a medida que aumenta la temperatura disminuye la proporción de AGI con respecto a la proporción de AGS. Cuando se realiza una cuantificación de las manchas correspondientes a cada fracción de ácidos grasos se observa que la relación AGI/AGS disminuye notablemente con el aumento de temperatura (Figura 6(b)).

Con relación a la composición de ácidos micólicos, también se puede observar claramente una modificación de los perfiles de acuerdo a la temperatura. En la figura se discriminan varias manchas que corresponden a las diferentes sub-familias de ácidos micólicos. Los ácidos α'-micólicos disminuyen a medida que lo hace la temperatura, volviéndose casi indistinguibles a 25°C; los ácidos ε-micólicos se comportan al revés que los anteriores, aumentando con el descenso de temperatura. Por su parte, los ácidos α-micólicos aumentan a 25°C (Figura 6 a).

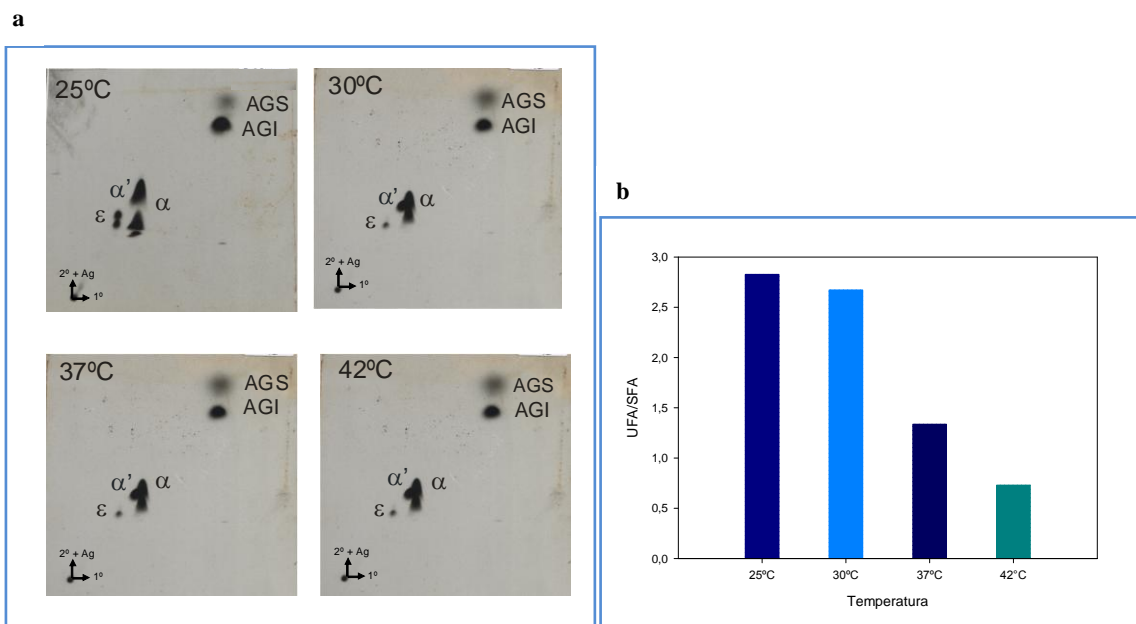


Figura 6. Análisis de los lípidos de *M. smegmatis* mc²155 a diferente temperatura mediante TLC. (a) TLC-2D de MEAMs y MEAGs extraídos a partir de cultivos crecidos a 25, 30, 37 y 42°C en placas con AgNO₃. Se sembraron 40.000 cpm y se corrieron 2 veces en hexano:acetato de etilo (95:5) en la primer dirección y 3 veces en éter de petróleo:éter etílico (85:15) en la segunda dirección (en presencia del ion Ag⁺). AGS: ácidos grasos saturados; AGI: ácidos grasos insaturados; α: ácidos α-micólicos; α': ácidos α'-micólicos; ε: ácidos epoxi-micólicos. (b) Cuantificación de ácidos grasos: Relación Ácidos grasos Insaturados (AGI) / Ácidos Grasos Saturados (AGS) según la temperatura de crecimiento. La cuantificación se realizó mediante el software ImageQuant (versión 5.2).

Por otra parte, se analizó la composición de ácidos micólicos a 20 y 37°C mediante MALDI/MS. Se trabajó con MEAMs obtenidos por metil esterificación de los ácidos grasos totales de cultivos crecidos en las condiciones mencionadas. Luego se separaron en una TLC preparativa desde donde se extrajeron por raspaje las manchas correspondientes a cada subfamilia de ácidos micólicos y fueron analizadas por MALDI/MS (Tabla 1).

Subfamilia	Temperatura	
	20°C	37°C
α	C75 y C77	C77 y C79
α'	C66 y C68	C62 y C64
ε	C76 y C78	C77 y C79

Tabla 1: Perfil de ácidos micólicos de *M. smegmatis* mc²155 a diferente temperatura. Análisis de MALDI/MS de las subfamilias de ácidos micólicos α, α' y ε de cultivos de *M. smegmatis* mc²155 crecidos a 20 y 37°C. Se muestran los ácidos micólicos de intensidades mayoritarias (de 60 a 100%).

A menor temperatura predominan cadenas más cortas de los ácidos α y ϵ micólicos y éstas se elongan a medida que asciende la temperatura. Además, aumenta el predominio de ácidos grasos de número impar de carbonos, que se produce por la introducción de metil-ramificaciones en la cadena del meromicolato. En el caso de los ácidos α' micólicos, a 20°C la longitud de cadena es mayor que a 37°C y además predominan las dobles insaturaciones (C66:2 y C68:2 a 20°C vs C62:1 y C64:1 a 37°C). Este fenómeno opuesto que se observa con la longitud de los ácidos α' micólicos con relación a las otras dos especies presentes, puede ser explicado en base a la presencia de uno o más dobles enlaces en las cadenas aciladas.

Además de la composición de ácidos micólicos, estudiamos la composición de ácidos grasos de cadena corta-media que forman parte de los fosfolípidos de membrana, de los lípidos de membrana externa y que constituyen los precursores para FASII. En la figura 7 se representa el análisis del perfil de dichos ácidos grasos a diferentes temperaturas mediante GC-MS.

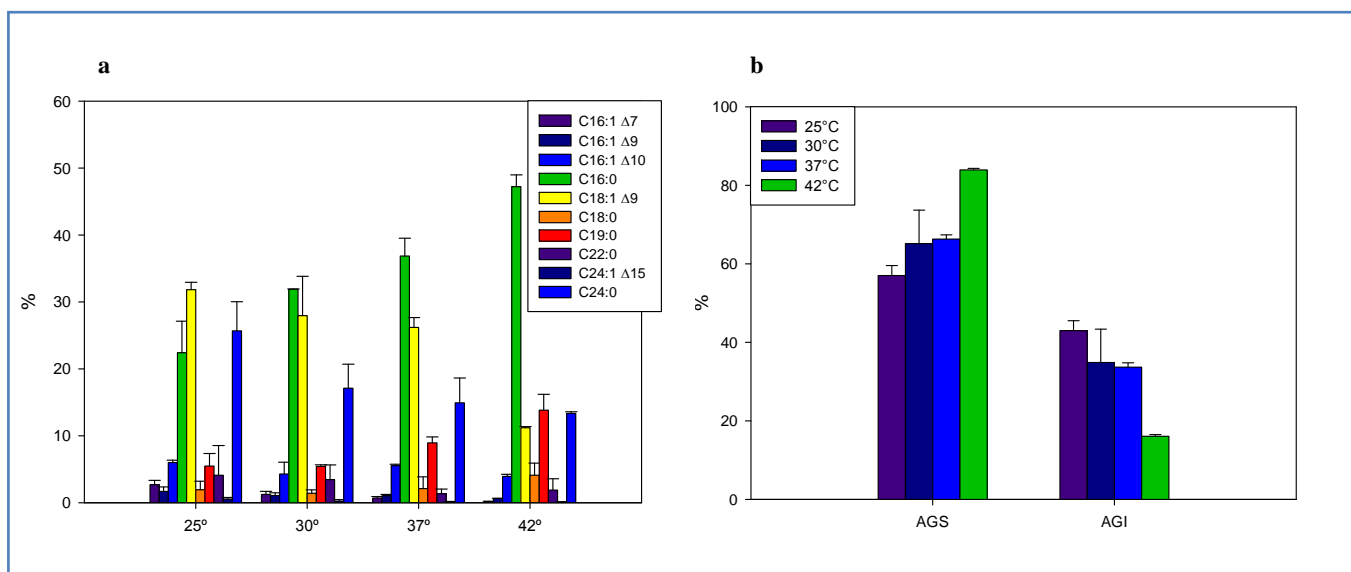


Figura 7. Perfil de ácidos grasos de cadena corta-media de *M. smegmatis* mc²155 a diferente temperatura (a) Perfil de GC-Masa de metil-ésteres de ácidos grasos de *M. smegmatis* mc²155 de cultivos crecidos a 25, 30, 37 y 42°C. Cultivos de *M. smegmatis* mc²155 fueron crecidos a las temperaturas indicadas hasta una D.O₆₀₀=1. Se obtuvieron los MEAGs y fueron cuantificados por GC-MS. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes. (b) Comparación de las proporciones de AGS y AGI a diferente temperatura.

Como ya se había observado por TLC, la proporción de AGI totales aumenta a menor temperatura, variando de 42,97% a 25°C a 16,08% a 42°C. Estas variaciones se corresponden con un descenso o aumento en el porcentaje de AGS, respectivamente (57,02% a 25°C y 83,91% a 42°C) (Figura 7b). En la figura 7a, se puede destacar que los cambios en las proporciones de un

ácido graso en particular mantienen un equilibrio entre sus formas saturada e insaturada. Esto sugiere que son los AGS quienes dan origen a sus respectivos AGI y por lo tanto es indicativo de que existe un mecanismo de introducción de dobles enlaces sobre los AGS completamente formados. Por ejemplo, el ácido oleico (C18:1) varía de 31,82% a 25°C a 11,2% a 42°C y en concordancia su precursor saturado, ácido esteárico, presenta un mayor porcentaje a 42°C (4,16%) respecto de 25°C (1,27%). En la figura 7 se observa también que el ácido lignocérico (C24:0) aumenta a menor temperatura. En la TLC de la figura 6a se puede apreciar que existe una mayor cantidad de ácidos micólicos a 25°C. El ácido tuberculosteárico (aC19:0) proveniente de la metilación del ácido oleico aumenta a medida que lo hace la temperatura y además su precursor C18:1 disminuye.

Se determinó además, la posición de los dobles enlaces de los AGI mediante GC-MS de los aductos de los MEAGs obtenidos como se indica en Materiales y Métodos (Tabla 2 y figura 8).

Metil-Ésteres de Ácidos Grasos	Tiempo de Retención (RT) (min)	Fragmentación Iónica (m/z) de los Aductos de DMDS		
		[M] ⁺	Fragmento ω	Fragmento Δ
C16:1 Δ 7	20,47	362	173	189
C16:1 Δ 9	20,55	362	145	217
C16:1 Δ 10	20,64	362	131	231
C17:1 Δ 9	22,09	376	159	217
C18:1 Δ 9	23,69	390	173	217
C20:1 Δ 11	26,55	418	173	245
C22:1 Δ 13	29,31	446	173	273
C24:1 Δ 15	31,89	474	173	301

Tabla 2. Análisis de los aductos de MEAGs de *M. smegmatis* mc²155. Fragmentación iónica característica de los derivados de la reacción de MEAGs con dimetil disulfuro (DMDS) e Iodo. Estos aductos se analizaron por GC-MS y se muestran los iones relevantes. [‡] corresponde al ion molecular según la longitud de la cadena carbonada. * Iones correspondientes al fragmento que contiene el extremo alifático de la cadena carbonada. [†] Iones correspondientes al fragmento que incluye el extremo carboxilo de la cadena de los ácidos grasos.

Se encontraron dobles enlaces en diferentes posiciones de las cadenas aciladas. *M. smegmatis* posee tres isómeros de C16:1, donde la posición del doble enlace varía de la posición $\Delta 7$ a $\Delta 9$ y $\Delta 10$. Este resultado sugiere que existirían diferentes actividades enzimáticas que generen estos diferentes tipos de insaturaciones motivando nuestro interés de analizar genéticamente el fenómeno y revelar sus identidades.

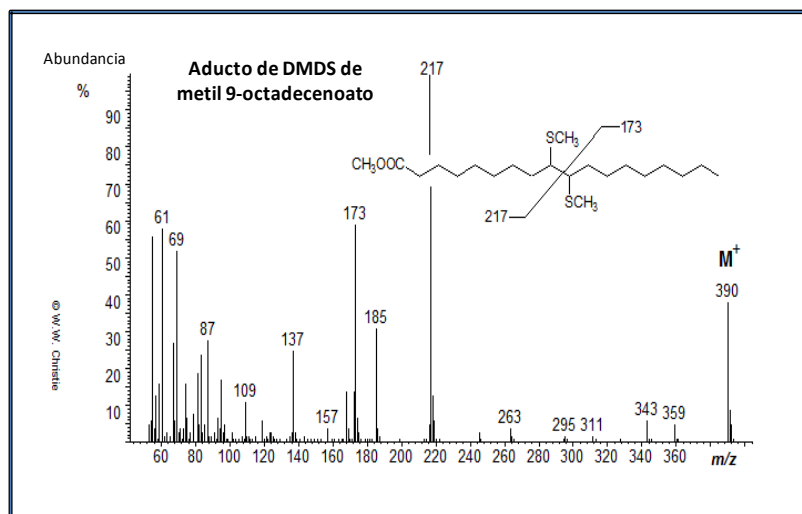


Figura 8. Espectro de masa del aducto de DMDS de C18:1 $\Delta 9$. Los iones a m/z 390, 173 y 217 corresponden a M^+ , fragmento ω y fragmento Δ de la molécula, respectivamente. Fuente: http://lipidlibrary.aocs.org/ms/arch_me/me_to2db/M0381.htm

5.2.1 Análisis genómico de las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155.

Con el objetivo de determinar la existencia de genes homólogos con la estearoil-desaturasa DesA3 de *M. tuberculosis*, se realizó una búsqueda bioinformática sobre el genoma de *M. smegmatis* mc²155, encontrándose que esta especie posee cuatro marcos de lectura abiertos con homología a dicha desaturasa. (Tabla 3).

GEN	% Identidad	% Similitud	Función predicha
<i>MSMEG_1211</i>	46,8	58,7	Desaturasa de ácidos grasos
<i>MSMEG_1886</i>	68,6	76,3	Desaturasa de ácidos grasos
<i>MSMEG_1743</i>	41	54,3	Desaturasa de ácidos grasos
<i>MSMEG_6835</i>	37,4	53,3	Desaturasa de ácidos grasos

Tabla 3. Porcentajes de identidad y similitud de las desaturasas predichas de *M. smegmatis* mc²155 con DesA3 de *M. tuberculosis*. Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Las proteínas codificadas por dichos genes, poseen las características cajas de histidina de las acil-CoA y acil-lípido desaturasas con la disposición **HX₃H**, **HX₃HH** y **QX₂HH**. Estas cajas de histidina estarían coordinado un átomo de hierro formando parte del sitio activo de las enzimas (Figura 9).

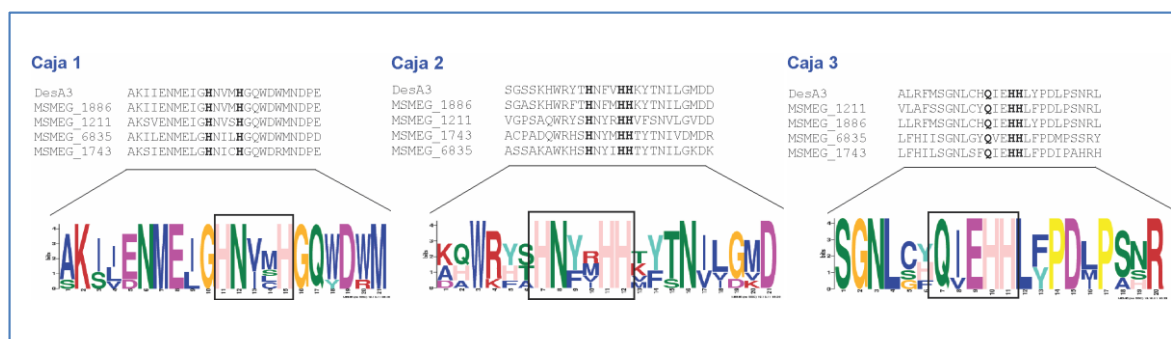


Figura 9. Alineamiento de secuencias correspondiente a las regiones de las cajas de histidina de las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155 y DesA3 de *M. tuberculosis*. Se utilizaron los programas ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>). Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Además de la homología de secuencia, tres de ellas comparten con DesA3 la organización génica, codificándose corriente arriba de los genes *MSMEG_1886*, *MSMEG_1743* y *MSMEG_6835* las respectivas óxido-reductasas hipotéticas OR1885, OR1742 y OR6836, codificadas por los genes *MSMEG_1885*, *MSMEG_1742* y *MSMEG_6836*, que participan en el transporte de electrones en la reacción de desaturación. Estas proteínas tienen un porcentaje de identidad con la óxido-reductasa de *M. tuberculosis* (codificada por el gen *rv3230c*) de 75 y 35% para OR1885 y OR1742 y de 43%

para OR6836, pero la última proteína solamente se alinea con la porción C-terminal de la proteína codificada por *rv3230c*. Todas ellas son proteínas de unión a hierro-azufre con un dominio flavodoxina-reductasa.

La figura 10 muestra un árbol filogenético de distancias construido a partir del alineamiento múltiple de secuencias de desaturasas del género *Mycobacterium*. Se puede observar que la desaturasa Des1886 comparte un ancestro común con DesA3. Además estaría muy cercana evolutivamente de la desaturasa Des1 de *M. phlei* (83% identidad de secuencia). Se puede decir también que todas estas desaturasas pertenecerían a grupos evolutivos diferentes si se consideran las distancias en el árbol. Si bien Des1886 y Des1211 provendrían de un mismo antecesor, habrían divergido en el tiempo, lo mismo que Des1743 y Des6835. Tanto Des1211 como Des1743 se encuentran muy relacionadas con las desaturasas Des2 (70% de identidad) y Des3 (75% de indentidad) de *M. phlei*, respectivamente. De esto se desprende que tanto *M. smegmatis* como *M. phlei* poseen tres desaturasas relacionadas evolutivamente que probablemente comparten la misma función biológica.

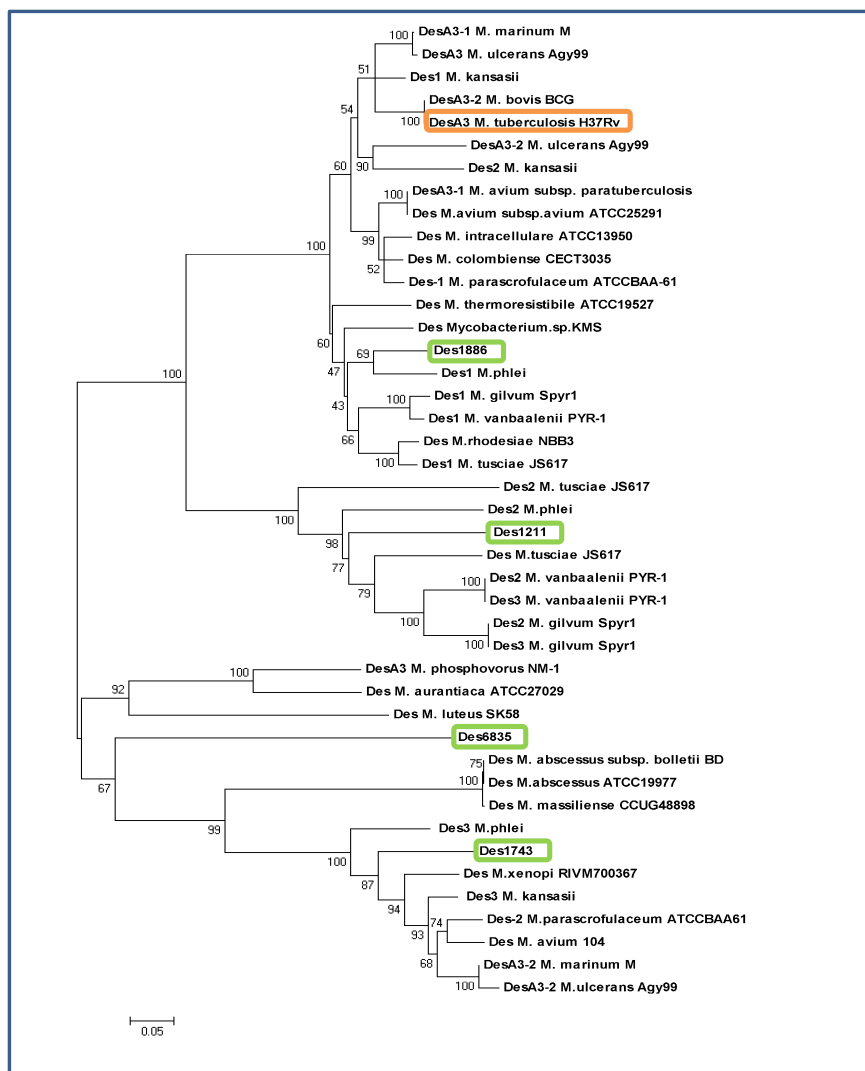


Figura 10. Árbol filogenético de las desaturasas de ácidos grasos del género *Mycobacterium*. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas utilizando el programa ClustalW y se construyó el árbol de distancias con el programa MEGA5 mediante el método de vecinos próximos NJ con un *bootstrap* de 1000 iteraciones. En recuadros verdes se resaltan las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155 y en anaranjado DesA3 de *M. tuberculosis*.

5.2.2 Análisis de la expresión transcripcional de las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155.

Analizando las regiones promotoras tanto de las desaturasas como de sus óxido-reductasas se encontraron secuencias invertidas repetidas en algunos de los promotores que podrían ser regiones de reconocimiento de proteínas regulatorias (Tabla 4).

Promotor-Gen	Secuencia palindrómica (5'-3')
P1885	(-229) <u>GGTCGCGTTGCGCGACG</u>
P1741	(-127) <u>CCTGGCGCGCGTCGTGGCGCGACC</u>
P1742	(-213) <u>GGTCGAGTTTTCCCGCGCGC</u>
P1743	(-104) <u>TCTCGGCATCCGCGACC</u>
P6835	(-146) <u>GCACGGCGATCGCGACC</u>

Tabla 4. Secuencias invertidas repetidas encontradas en las regiones promotoras de las desaturasas, óxido-reductasas y la proteína reguladora codificada por *MSMEG_1741* de *M. smegmatis*. Se utilizó el programa *einverted* de <http://emboss.bioinformatics.nl/>. La secuencia consenso es GGTCGCG---CGCGACC. Se muestran en negrita las bases diferentes respecto del consenso en cada secuencia.

En la tabla se observa además que la secuencia palindrómica encontrada, también se localiza en la región promotora del gen *MSMEG_1741*, que codifica para una proteína reguladora de la familia TetR.

En base a este análisis y teniendo en cuenta los cambios que observamos ante las variaciones de temperatura, nos preguntamos si existiría alguna modificación en los niveles de expresión transcripcional de nuestras desaturasas. Por ello se decidió construir fusiones transcripcionales de los promotores analizados seleccionando fragmentos de entre 500 y 600 pb de longitud corriente arriba del sitio +1 de los genes correspondientes.

5.2.3 Efecto de la temperatura sobre la expresión.

Las regiones promotoras de cada desaturasa y su óxido-reductasa fueron clonadas corriente arriba del gen *lacZ* en el vector pSM128, como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Se crecieron cultivos de estas cepas a 37°C hasta una $DO_{600} = 0,5$, se dividieron los cultivos en dos fracciones. Una de ellas fue traspasada a 25°C y la otra permaneció a 37°C. Por último, se tomaron alícuotas de los cultivos y se midió la actividad β -galactosidasa (Figura 11).

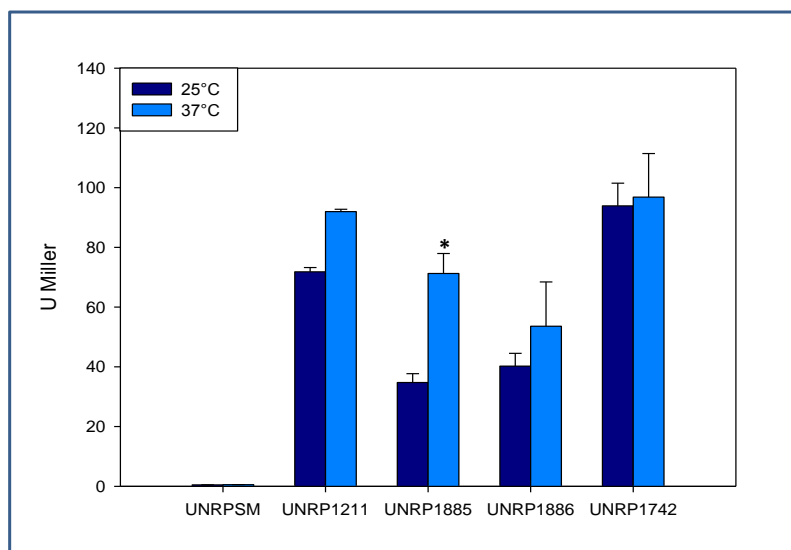


Figura 11. La expresión del operon *MSMEG_1885/1886* aumenta a 37°C. Cultivos de las cepas UNRPSM, UNRP1211, UNRP1885, UNRP1886 y UNRP1742 fueron crecidos cultivos a 37°C hasta una $DO_{600} = 0,5$, se dividieron en dos alícuotas y una de ellas se traspasó a 25°C permaneciendo la otra a 37°C. Se realizó un análisis estadístico mediante el test t-student. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes.

En la figura se grafica la actividad β -galactosidasa como medida de la actividad reportera de la transcripción de los genes de las desaturasas y sus óxido-reductasas de *M. smegmatis* mc²155. Las cepas fueron denominadas UNRPSM, UNRP1211, UNRP1885, UNRP1886 y UNRP1742 y contienen respectivamente el vector vacío o las fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *MSMEG_1211*, *MSMEG_1885*, *MSMEG_1886* y *MSMEG_1742*. También se determinó la actividad reportera para los genes *MSMEG_1743*, *MSMEG_6835* y *MSMEG_6836*, pero dichas actividades fueron indetectables, lo cual significaría que los mencionados, serían genes que no se expresan, al menos en las condiciones ensayadas.

Predicciones bioinformáticas realizadas por los programas
<http://linux1.softberry.com/berry.phtml> y <http://operondb.cbcb.umd.edu/cgi->

bin/operondb/pairs.cgi?genome_id=609 muestran que cada desaturasa, excepto Des1211 se codifica en un operón con su óxido-reductasa. En estos casos, podrían existir mecanismos regulatorios diferentes: o bien que las desaturasas se transcriban a partir de su propio promotor y/o a partir del promotor de la óxido-reductasa (que sería el promotor del operón); o que las desaturasas se transcriban solamente a partir del promotor de la óxido-reductasa, es decir que exista solo un promotor que controle la transcripción del operón entero. Los casos en los que existen dos promotores, o más bien un promotor interno que dirija la expresión de las desaturasas, tendrían una regulación más fina y tal vez responderían a diferentes estímulos para lograr una actividad enzimática deseada. Entonces, nuestros resultados sugieren que Des1743 solamente sería transcrita a partir del promotor del operón y Des6835 no estaría siendo transcrita en las condiciones ensayadas, ni a partir de su propio promotor, ni a partir del promotor del operón. Por su parte, Des1886 tendría una doble regulación transcripcional pudiendo expresarse tanto desde su propio promotor como desde el promotor de su óxido-reductasa.

En cuanto a la expresión de aquellos promotores activos, ninguno mostró una regulación por temperatura como podría haberse esperado. Los datos revelan que, contrariamente a lo esperado, estos promotores serían más activos a 37°C que a 25°C, pero solo existen diferencias estadísticas entre los datos a ambas temperaturas para el promotor de la óxido-reductasa OR1885 ($P \leq 0,001$). Probablemente, a 37°C se necesiten más precursores de todos los componentes estructurales de las células porque la velocidad de duplicación es mayor y por lo tanto todas las enzimas en general se estén sintetizando más, o al menos aquellas involucradas en síntesis de estos componentes.

5.2.4 Efecto del ácido oleico sobre la expresión transcripcional de las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155.

Para profundizar en el estudio de la expresión de los promotores de las desaturasas y óxido-reductasas de *M. smegmatis* y elucidar si existe regulación por metabolitos, se decidió evaluar el efecto de la presencia de un ácido graso insaturado en el medio de cultivo sobre la expresión de estos promotores. Se crecieron cultivos de las cepas reporteras en medio sin ácidos grasos hasta una $DO_{600}=0,5$ y se dividieron en dos alícuotas, a una de las cuales se le adicionó ácido oleico en forma de OADS (Figura 12). Previamente, se ensayaron diferentes concentraciones de ácido oleico (0,005% v/v, 0,01% v/v, 0,025% v/v y 0,05% v/v) y se observó una disminución dosis dependiente en la actividad reportera. Se muestra la concentración más alta ensayada (0,05% v/v).

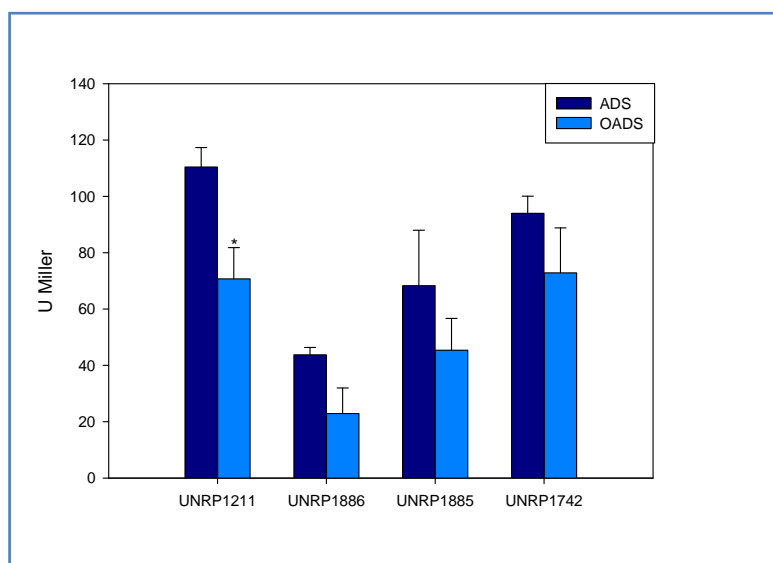


Figura 12. El ácido oleico regula la transcripción de *MSMEG_1211* a 37°C. Actividad β -galactosidasa a 37°C en presencia de ácido oleico. Se crecieron cultivos de las cepas UNRPSM, UNRP1211, UNR1885, UNRP1886 y UNRP1742 a 37°C hasta una $DO_{600} = 0,5$, se dividieron en dos alícuotas y a una de ellas se le adicionó ácido oleico al 0,05% en forma de OADS. Se realizó un análisis estadístico mediante el test t-student. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes.

Si bien se puede apreciar un descenso en los niveles de actividad reportera para todas las cepas ensayadas en presencia de ácido oleico, esta disminución solamente sería estadísticamente significativa para la cepa UNRP1211.

Cuando se analiza el genoma de *M. smegmatis* mc²155 se encuentra un homólogo de DesT de *P. aeruginosa*, el regulador global de la síntesis de ácidos grasos insaturados en esta bacteria. Este regulador se codifica corriente arriba del operón DesAB en sentido contrario a estos genes. El gen *MSMEG_1741*, es un regulador de la familia TetR que se codifica corriente arriba del operón Des1742-1743 y en sentido contrario a este. En la figura 13 se muestra un alineamiento de secuencia de los dos reguladores mencionados y la organización génica de las desaturasas y óxido-reductasas de ambas especies. Estas proteínas regulatorias tienen un 35,41% de identidad de secuencia y mantienen la misma organización génica, por lo tanto es probable que respondan al mismo tipo de regulación (Figura 13 a). Además la región promotora de ambos genes se encuentra solapada con la región codificante de las respectivas óxido-reductasas, es decir que no existe una región intergénica propiamente dicha entre los reguladores y las óxido-reductasas (figura 13 b).

Adicionalmente, se encontró la misma secuencia palindrómica en las regiones promotoras de los genes de la desaturasa, la óxido-reductasa y el propio regulador. Por su parte, el genoma de *M. tuberculosis* no contiene en la región cercana a DesA3 ninguna proteína con función regulatoria.

Con los resultados obtenidos hasta el momento no es posible asignar una función específica a la proteína codificada por *MSMEG_1741*, DesR, pero la disminución en los niveles de expresión de los promotores analizados en presencia de ácido oleico, junto con la homología de secuencia y organización génica, respecto del modelo de *P. aeruginosa*, sugieren fuertemente que esta proteína estaría involucrada en el proceso de regulación de la síntesis de AGI en *M. smegmatis*.

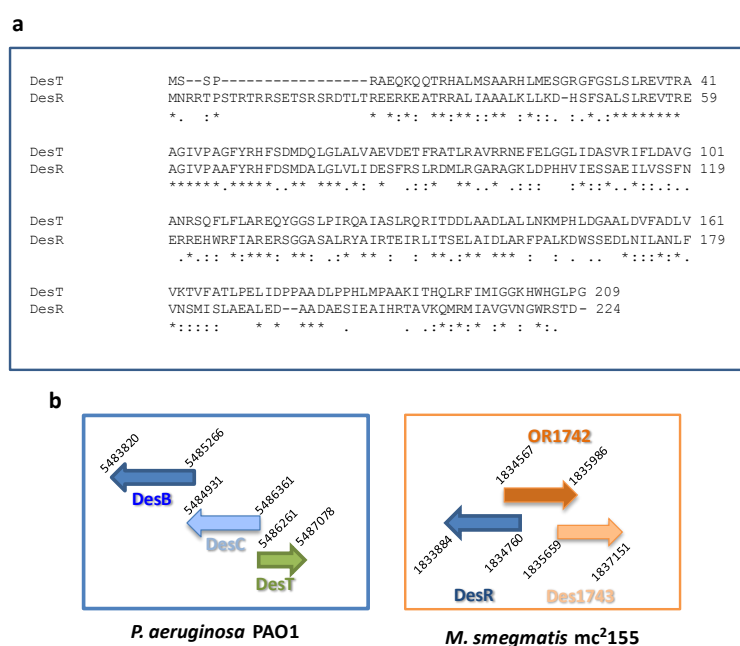


Figura 13. Reguladores transcripcionales de *P. aeruginosa* PAO1 y *M. smegmatis* mc²155. (a) Alineamiento de secuencias de las proteínas de **DesT** (*P. aeruginosa* PAO1) y **DesR** de *M. smegmatis* mc²155. Se utilizó el programa ClustalW. **(b)** Organización génica de las desaturasas, óxido-reductasas y reguladores transcripcionales de *P. aeruginosa* PAO1 y *M. smegmatis* mc²155. Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

5.3 DISCUSIÓN

Los cambios de temperatura representan un desafío fisiológico para los organismos poiquiloterms. Las membranas celulares se componen de una mezcla compleja de especies moleculares que colectivamente le confieren una naturaleza dinámica fluida a las mismas y que resulta esencial para el mantenimiento de las funciones de las proteínas embebidas en ellas. Es así que los cambios de temperatura ambiente pueden alterar las propiedades físicas de las membranas requiriendo un ajuste metabólico rápido para recuperar la fluidez necesaria [151, 152].

Los cambios de temperatura son uno de los factores que más afectan la composición lipídica de las membranas bacterianas, pero también se reflejan en otras características fisiológicas. Por ejemplo, *M. tuberculosis* es un patógeno humano cuya temperatura de crecimiento se limita al rango de temperatura de su hospedador (alrededor de los 37°C). Por su parte, *M. smegmatis* es una bacteria saprófita ambiental y a pesar de estar genéticamente relacionada a *M. tuberculosis*, es capaz de crecer en un rango de temperaturas mucho más amplio. En cada temperatura ensayada *M. smegmatis* muestra diferentes velocidades de crecimiento. Si bien esta especie es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, encuentra su temperatura óptima entre los 37 y los 42°C. La capacidad de adaptarse a estas condiciones radica en la posibilidad de modificar la composición de su membrana plasmática pero también de su membrana externa incluyendo los ácidos micólicos [153]. Cuando se evalúan las alteraciones producidas por cambios de temperatura sobre el grado de desorden molecular de las membranas, se observa que el frío causa una disminución en la fluidez y un subsecuente aumento en la rigidez de las mismas, que puede ser compensada por la desaturación de los ácidos grasos. En forma opuesta, el calor provoca una fluidificación de las membranas, lo que se compensa con la síntesis de proteínas que las estabilicen y con el reemplazo en cantidades variables de los AGI por AGS sintetizados *de novo* [154]. De esta manera, un aumento de temperatura conlleva una elongación de las cadenas carbonadas, tanto de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos, como así también de los ácidos micólicos. Además implica una disminución en la proporción de AGI. Por el contrario, un descenso en la temperatura de crecimiento promueve la introducción de dobles enlaces en las cadenas aciladas de fosfolípidos y de ácidos micólicos a expensas de la longitud de cadena que disminuye para otorgarle mayor fluidez a esos ácidos grasos.

Estos cambios en las proporciones de ácidos grasos en la membrana de *M. smegmatis* concuerdan con el comportamiento observado en *M. phlei* creciendo en un rango de temperaturas de 23 a 50°C. Las dos especies contienen los mismos tipos de ácidos grasos de cadena corta-media (C14-C19) en su membrana. Aún así, la tasa de disminución en la relación AGI/AGS es diferente para ambas. Así, mientras que para *M. smegmatis* la relación cambia de 2,83 a 25°C a 2,67 a 30°C, para *M. phlei* los valores son 5,7 y 1,2 para 23 y 30°C, respectivamente. Entre tanto, en el rango de 30 a 42°C para *M. smegmatis* el cambio en la relación AGI/AGS es de 2,67 a 0,73, respectivamente y para *M. phlei* es de 1,2 a 30°C y 0,8 a 40°C. La temperatura óptima de crecimiento de las dos especies es similar, aunque el tiempo de duplicación de *M. phlei* a 23°C es de 18 hs [155]. Esto refleja que cada especie regula de manera específica la composición lipídica de su membrana en función de las condiciones medioambientales y en este sentido se ve reflejado un mayor grado de adaptación a una temperatura menor en la velocidad de crecimiento de *M. smegmatis*.

Existen en la bibliografía numerosos ejemplos de modificación en la composición de lípidos de micobacterias o bacterias cercanas a ellas cuando cambia la temperatura de crecimiento. Tales son los casos de *M. phlei* [156], *M. thermoresistible* [157], *Nocardia spp.* [158], diferentes cepas de *M. smegmatis* [153, 159], *Rhodococcus spp.* [160], *Streptomyces griseus*, *Brevibacterium fermentans* [161]. Sin embargo, estos estudios son meramente analíticos y descriptivos o bien, han sido realizados con cepas no trazables. Por otra parte, existe un reporte que muestra el análisis del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra a diferentes temperaturas (16, 20 y 25°C) [162]. En este trabajo, se observa que una disminución en la temperatura produce un descenso en las proporciones de ácidos micólicos y AGI de C16 y C19 y un aumento en los niveles de C24-26 saturados relativos al total de ácidos grasos sintetizados. Estos resultados sugieren que *M. tuberculosis* no es capaz de regular su composición lipídica a temperaturas por debajo de los 37°C y por lo tanto no puede adaptarse y sobrevivir en estas condiciones [162]. Resulta evidente entonces que las bacterias comparten este mecanismo universal de adaptación ante cambios en la fluidez de membrana.

Con relación a las posiciones de los dobles enlaces en las cadenas carbonadas de los AGI se puede hipotetizar la existencia de diferentes actividades desaturantes de una misma enzima, o bien que existan diferentes enzimas que introduzcan los dobles enlaces solamente en una posición. Así, la presencia de C16:1 Δ 7, C16:1 Δ 9 y C16:1 Δ 10 puede implicar que haya tres desaturasas diferentes, o bien, una actividad isomerasa que cambie la posición del doble enlace previamente formado. Por otra parte, de acuerdo a las posiciones de los dobles enlaces encontradas en los ácidos grasos analizados por GC-MS, se podrían establecer tres actividades desaturantes: a) una que inserte un doble enlace en la posición Δ 7 del ácido palmítico y este precursor sea elongado a C18:1 Δ 9, C20:1

$\Delta 11$, C22:1 $\Delta 13$ y C24:1 $\Delta 15$; b) una que introduzca un doble enlace exclusivamente en posición $\Delta 9$ de sustratos de longitudes diferentes (como C16:1 $\Delta 9$, C17:1 $\Delta 9$ y C18:1 $\Delta 9$) y c) una actividad única y específica para C16:1 $\Delta 10$ (Figura 14). Entonces, el ácido oleico (C18:1) podría provenir de dos vías: o de la desaturación de su correspondiente AGS (C18:0) o bien de la elongación del ácido 7-hexadecenoico (C16:1 $\Delta 7$). Por su parte, los AGI con cadenas carbonadas más largas (C20, C22 y C24) provendrían de la elongación de los ácidos 7-hexadecenoico u oleico. Esto se puede deducir de proceso mismo de síntesis de ácidos grasos en el que se va adicionando una molécula de acetato con dos átomos de carbono en cada ciclo de FASI. No se descarta la existencia de una o varias actividades desaturantes para ácidos grasos de estas longitudes de cadena más extensas. Habiendo actividades elongantes descritas en *M. smegmatis* [163] y *M. leprae* [164], esta hipótesis tiene sustento aunque deberá comprobarse experimentalmente.

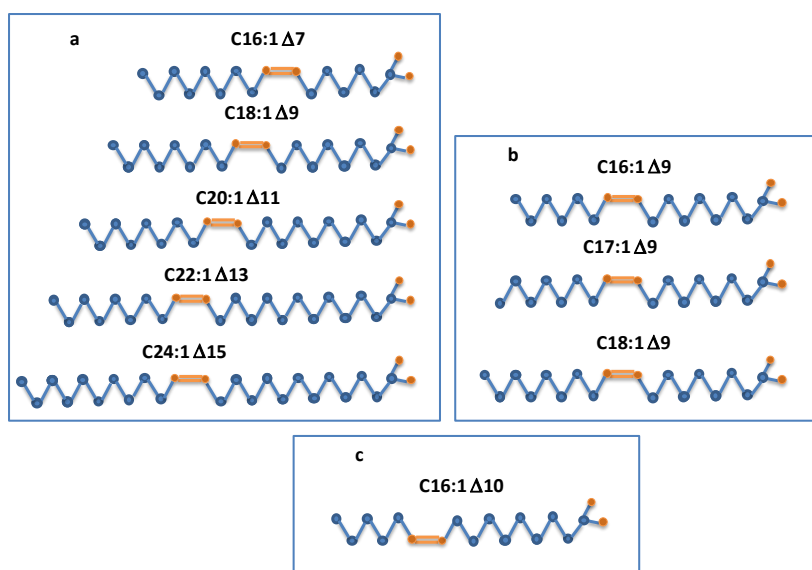


Figura 14. Posibles actividades desaturantes en *M. smegmatis* mc²155. Esquema de las posiciones de dobles enlaces en las cadenas carbonadas de los ácidos grasos presentes en *M. smegmatis* mc²155.

La supervivencia de las bacterias depende de la homeostasis de las membranas lipídicas y de la habilidad de ajustar la composición de estos lípidos para aclimatare a diferentes medioambientes, optimizando así el crecimiento en estas condiciones. Los componentes de membrana más costosos de sintetizar desde el punto de vista energético, son los ácidos grasos. Además de su rol estructural, éstos determinan también la viscosidad de las membranas lo cual involucra muchas funciones asociadas como los transportes pasivo y activo de solutos y también

interacciones proteicas. Por todo esto, las bacterias han desarrollado mecanismos sofisticados para controlar la expresión de los genes responsables de la formación de ácidos grasos y para modificar las cadenas aciladas preexistentes con el fin de ajustar las propiedades biofísicas de los ácidos grasos y mantener las membranas estables [165]. La capacidad de los microorganismos para adaptarse a diferentes temperaturas depende de la habilidad de un sensor de percibir un cambio en la temperatura. La membrana, que actúa como una interfase entre los medios interno y externo de las células puede ser uno de los principales sensores. Es necesario que estos sensores tengan la capacidad de percibir la señal y transducirla al genoma, llevando en última instancia a la sobre expresión de los genes involucrados en la adaptación a este tipo de cambio medioambiental [166]. La inducción de los genes de desaturasas para compensar una disminución en la fluidez de membrana es un mecanismo extendido entre casi todos los taxa de organismos poiquiloterms, desde bacterias hasta, plantas, peces y animales [55, 167, 168].

Aunque existen innumerables ejemplos de organismos (no solo bacterias, sino también cianobacterias, parásitos, hongos, peces y plantas) que presentan mecanismos de sensado de los cambios de fluidez de membrana y transducción de la señal, este trabajo de tesis no estuvo dirigido a la búsqueda de tales proteínas en *M. smegmatis*. Se estudió, en cambio, la existencia de un mecanismo de regulación transcripcional de los genes con homología a desaturasas en esta bacteria, mediante fusiones transcripcionales de aquellas regiones promotoras al gen *lacZ*. Desafortunadamente, no se encontró tal mecanismo, que hubiera sido esperado, dada la amplia distribución del mismo en todos los dominios de la vida. Sin embargo, existen claras modificaciones en la composición lipídica. Por lo tanto, la ausencia de regulación directamente a nivel del promotor no descarta la posibilidad de que las regiones clonadas para los experimentos realizados, sean erróneas, y que los promotores verdaderos se encuentren corriente arriba de lo presupuesto. De hecho, los promotores micobacterianos pueden llegar a tener hasta 2 kb de longitud [169]. Tampoco es posible descartar que existan mecanismos regulatorios en otros niveles, como por ejemplo estabilidad de la vida media de los ARNm de las desaturasas (nivel post-transcripcional), como en el caso de *S. cerevisiae* [170]; o que sea la actividad de las proteínas lo que se encuentre regulado, más que su expresión transcripcional. Por ejemplo, a baja temperatura, *E. coli* aumenta la proporción de C18:1 y reduce la proporción de C16:0 [171, 172]. FabF, es requerida en estas condiciones para la elongación de C16:1 a C18:1 y es independiente de la síntesis de ARNm y proteína, demostrando que la regulación de la fluidez de membrana a baja temperatura en esta bacteria, depende de la actividad de la enzima pero no de su síntesis [57, 173].

Existen mecanismos alternativos que podrían ser los encargados de sensar los cambios de temperatura. Por ejemplo, cambios conformacionales o físico-químicos en el ADN, ARN y proteínas. La conformación del ADN es importante para la adaptación al frío. Esto queda demostrado porque la expresión de muchos genes en bacterias depende de la conformación del ADN, lo que a su vez depende de los cambios introducidos por la temperatura en el enrollamiento del mismo [174, 175]. Por ejemplo, la forma y tamaño de las células de *B. subtilis* no cambia luego de un descenso de temperatura, pero este descenso induce una compactación de los nucleótidos, lo que a su vez puede ser producido por cambios conformacionales en el ADN [176]. Por su parte, las moléculas de ARN tienen un gran potencial para actuar como sensores de la temperatura debido a su habilidad para formar estructuras terciarias [177] e híbridos ARN/ARN [178]. Ejemplos de ello son las proteínas LcrF de *Yersinia pestis* (regulador de virulencia) [179] y PrfA de *Listeria monocytogenes* (factor de transcripción activador de la virulencia) [180]. Los ARNm de estas dos proteínas a 25°C se encuentran formando una estructura secundaria que previene su traducción. A elevada temperatura estas estructuras se desarman, permitiendo la expresión de dichos genes. De esta manera, estos ARNm actuarían tanto como termosensores y mensajeros [179]. Las proteínas también pueden sufrir cambios conformacionales en respuesta a variaciones térmicas. En *Salmonella typhimurium*, la proteína TlpA tiene la capacidad de sensar variaciones de temperatura y regular la expresión de algunos genes. A 28°C esta proteína puede formar oligómeros y unirse al ADN reprimiendo su propia expresión. Pero cuando la temperatura aumenta, la oligomerización disminuye permitiendo la transcripción. La capacidad sensora de TlpA depende de su estructura de tipo *coiled-coiled*, lo que ilustra el sensado de temperatura a través de cambios en la conformación proteica [181-183]. También es conocido el mecanismo de sensado de la temperatura de proteínas que se fosforilan-desfosforilan, como el caso del sensor DesK de *B. subtilis* descrito en la introducción [113].

Todos estos ejemplos alientan la búsqueda del/de los mecanismo/s regulatorio/s de la síntesis de AGI en *M. smegmatis*, más allá del nivel transcripcional. Quedaría por determinar si existe alguna proteína regulatoria de la transcripción de los genes de las desaturasas y en qué condiciones actúa, o si la regulación se encuentra en los demás niveles descritos. La presencia del gen *MSMEG_1741* que codifica para un regulador transcripcional de la familia TetR, permite sugerir que la proteína producida por este gen podría estar involucrada en algún proceso regulatorio de la síntesis de AGI. Los miembros de la familia TetR son proteínas reguladoras ampliamente distribuidas en bacterias que presentan un dominio de unión a ADN HTH. Todas las proteínas de la familia TetR conocidas hasta el momento son represores y actuarían de una manera similar: la unión a una molécula inductora en un dominio no conservado de estas proteínas produce cambios

conformacionales en el dominio conservado de unión al ADN, resultando en la liberación del represor de su operador y permitiendo así la transcripción de los genes reprimidos [184]. En general los reguladores de la familia TetR reconocen secuencias palindrómicas en sus operadores de aproximadamente 15 pb. Sin embargo EthR, represor de EthA, activador de la droga etionamida de *M. tuberculosis*, reconoce una región operadora de 55 pb que se organiza como un palíndrome altamente degenerado que contiene pares de secuencias invertidas solapadas y repeticiones en tándem [185].

La homología de DesR con el regulador DesT de *P. aeruginosa*, junto con el hallazgo de secuencias palindrómicas en los promotores de las desaturasas y óxido-reductasas, e inclusive en la región promotora del propio DesR, serían indicios de la función de esta proteína. Además, el hecho de que este tipo de reguladores actúen uniéndose a moléculas efectoras (que en este caso podrían ser ácidos grasos), junto con la represión transcripcional en presencia de ácido oleico observada en este trabajo, sugerirían un posible papel regulatorio para esta proteína. Es importante destacar que está ampliamente reportado en la literatura el efecto que tienen los AGI sobre la expresión de los genes que sintetizan dichos AGI, tales son los casos de *S. cerevisiae* [186], *P. aeruginosa* [187, 188], *E. coli* [189], entre muchos otros. En general la regulación de los niveles transcripcionales está mediada por una proteína reguladora que es capaz de unirse a AGI o AGS y en este estado se une o se libera, respectivamente, de los promotores de los genes de síntesis de ácidos grasos insaturados, ya sean de la vía aeróbica o anaeróbica [135, 189].

6. CAPÍTULO II

6.1 Caracterización funcional de Des1886

6.1.1 Construcción de una mutante delecional en el gen *MSMEG_1886*

Con el objetivo de determinar las características funcionales de las desaturasas de *M. smegmatis*, y teniendo en cuenta la homología con la desaturasa DesA3 de *M. tuberculosis*, se decidió construir una mutante delecional en el gen *MSMEG_1886*, que resulta el más homólogo de los encontrados en nuestro modelo de estudio con aquella desaturasa (que por otra parte es la única presente en el genoma de *M. tuberculosis*). El entendimiento de la funcionalidad de esta/s enzima/s permitirá comprender y comparar las diferencias fisiológicas de crecimiento que presentan ambas especies.

Para la construcción de dicha mutante se utilizó la metodología desarrollada por van Kessel y Hatfull denominada *recombineering* [141], detallada en la sección Materiales y Métodos (Figura 15 a). La selección de clones mutantes se realizó en medio sólido 7H9-OADS-G-Hig y se incubaron las placas a 37°C por 3 a 5 días. Luego de obtenidos los clones resistentes a higromicina, la confirmación de la deleción se efectuó mediante PCR utilizando oligonucleótidos que hibridan por dentro de la construcción insertada y por fuera de la región genómica donde debe recombinar el fragmento (Figura 15 b). Se eligieron los oligonucleótidos que se indican en la figura para tener la certeza de que la recombinación ocurrió en la zona del genoma deseada y descartar así una recombinación ilegítima. Se realizó además la complementación de la mutación con una copia en *trans* del gen salvaje bajo el control de su propio promotor utilizando el vector integrativo pMV306.

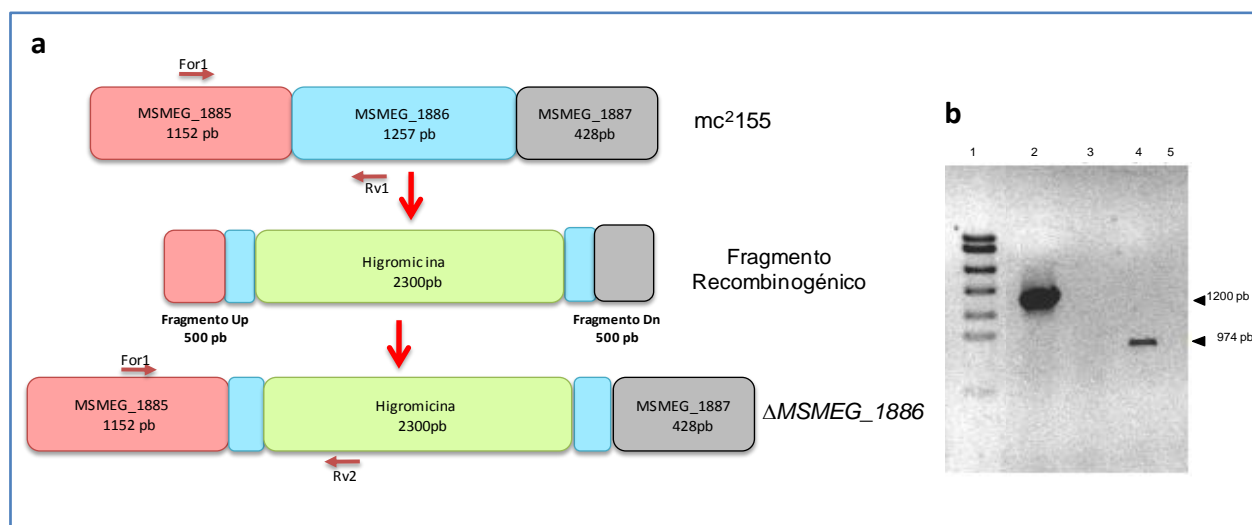


Figura 15. Esquema de la construcción del fragmento recombinogénico utilizado para deleccionar el gen *MSMEG_1886*. Confirmación de la delección. (a) Se construyó un fragmento lineal con dos zonas homólogas a la región blanco y un *cassette* de higromicina en medio de las dos. En la parte inferior se muestra la región genómica con el fragmento recombinado. Se muestran además los oligonucleótidos utilizados para la confirmación de la mutación. **(b)** PCR de confirmación de la delección de *MSMEG_1886*. Calles: 1: marcador de peso molecular; 2: banda de 1200 pb correspondiente al fragmento amplificado por los oligonucleótidos *For1* y *Rv1* en la cepa salvaje *mc*²155; 3: ausencia de banda obtenida de la amplificación con los oligonucleótidos *For1* y *Rv1* en la cepa mutante UNRA1886; 4: banda de 974pb correspondiente al fragmento amplificado por los oligonucleótidos *For1* y *Rv2* en la cepa mutante UNRA1886; 5: ausencia de banda obtenida de la amplificación con los oligonucleótidos *For1* y *Rv2* en la cepa salvaje *mc*²155.

6.2 Caracterización fenotípica de la cepa UNRA1886

6.2.1 Crecimiento en medio líquido

Se realizaron curvas de crecimiento en medio líquido 7H9-G-T-Hig utilizando ADS u OADS como suplementos a 25 y 37°C. Debido a que la cepa mutante fue obtenida en presencia de ácido oleico, se quiso determinar su capacidad de crecer en ausencia de este ácido graso (Figura 16).

La cepa UNRA1886 muestra un marcado retardo en el crecimiento a las dos temperaturas ensayadas respecto de la cepa salvaje, siendo más marcado el efecto a 25°C. La fase *lag* de crecimiento se extiende hasta las 72 hs a 25°C y hasta las 24 hs a 37°C en la cepa mutante. Una vez superada la fase *lag*, la cepa UNRA1886 tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 14 hs a 25°C, mientras que la cepa salvaje se duplica cada 8 hs. A 37°C el tiempo de duplicación luego de la fase *lag* es de 5 hs para UNRA1886 y de 3 hs para la cepa *mc*²155. La complementación de la

cepa mutante con una copia salvaje del gen en *trans*, recupera los niveles de crecimiento de la cepa mc^2155 a las dos temperaturas.

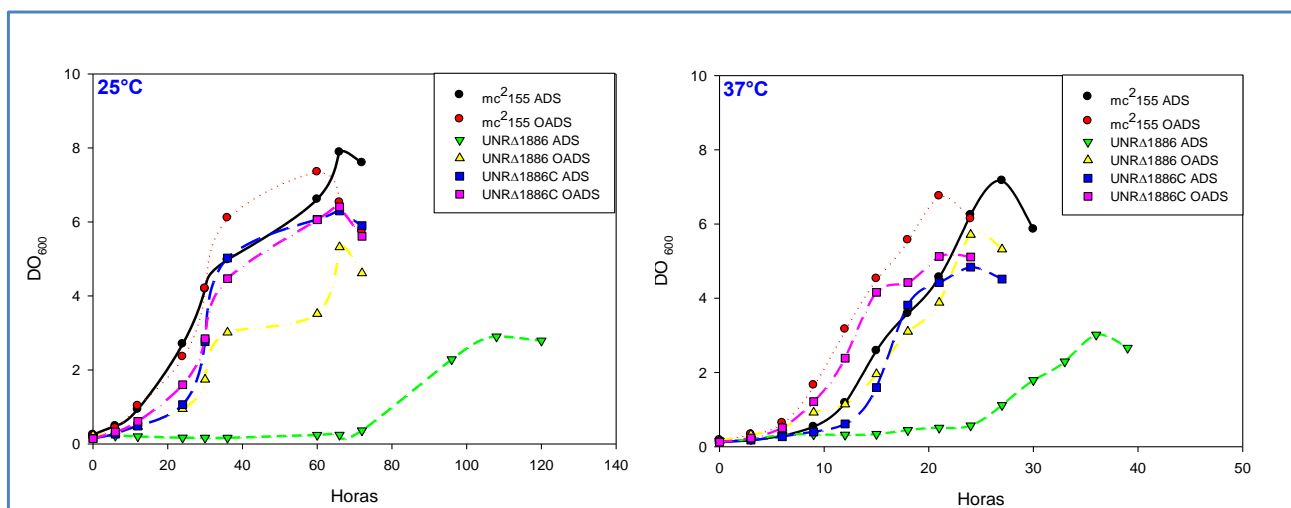


Figura 16. Curvas de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* salvaje mc^2155 , mutante UNRA1886 y complementada UNRA1886C a 25 y 37°C en presencia de ácido oleico. Se crecieron cultivos de las cepas mencionadas en medio 7H9-G-T-Hig con el suplemento de ADS u OADS a 25 (izquierda) y 37°C (derecha). Se tomaron alícuotas de cada cultivo a los tiempos indicados y se midió la DO_{600} . Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes.

Se realizaron también curvas de crecimiento en presencia de ácido palmitoleico (en forma de PADS) para evaluar el efecto de este ácido graso sobre el crecimiento de la cepa mutante (Figura 17). La figura muestra que el ácido palmitoleico, al igual que el ácido oleico es capaz de recuperar el defecto de crecimiento de la cepa mutante, aunque en menor medida que este. En las figuras 16 y 17 se observa también que todas las cepas analizadas crecen mejor en presencia de los AGI correspondientes independientemente de la temperatura. *M. smegmatis* es capaz de incorporar y utilizar ácidos grasos del medio de cultivo. De esta manera, requiere un gasto energético menor para la síntesis de estos metabolitos y puede así crecer más rápidamente. En el caso de la cepa UNRA1886, ambos ácidos grasos permiten una recuperación del crecimiento tanto a 25 como a 37°C. Este resultado indica, por un lado que el gen *MSMEG_1886* es importante para el crecimiento de *M. smegmatis* y más aún a bajas temperaturas. Por otro lado, el hecho de que el defecto de crecimiento se vea contrarrestado por el agregado de AGI al medio de cultivo, sugiere que el producto de este gen podría estar implicado en la vía de síntesis de los mismos. Es importante destacar en este punto, que la cepa UNRA1886 es capaz de crecer, aún en ausencia de AGI, lo que implica que existe alguna vía alternativa de síntesis de AGI en esta bacteria.

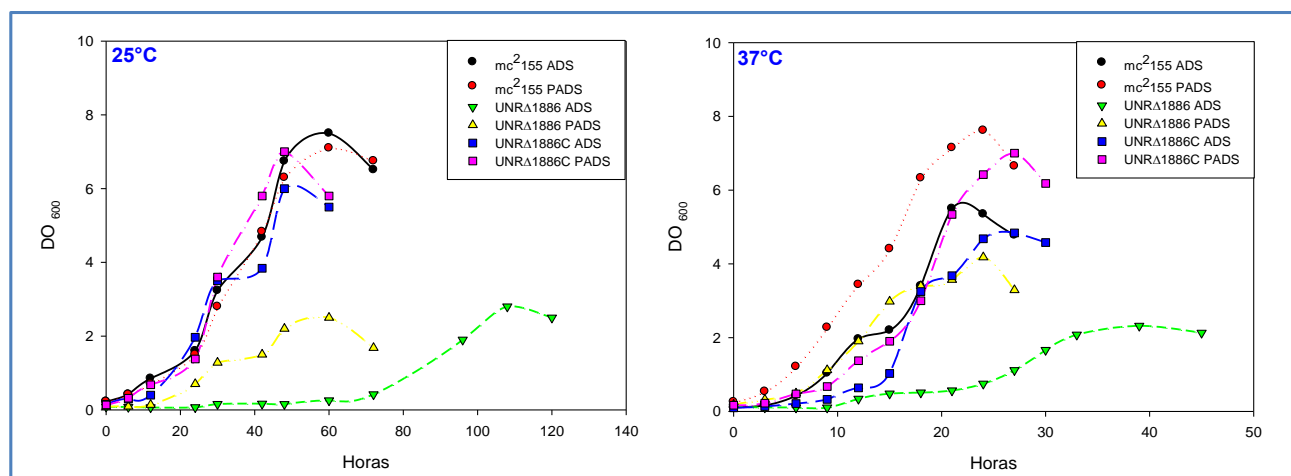


Figura 17. Curvas de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* salvaje mc²155, mutante UNRA1886 y complementada UNRA1886C a 25 y 37°C en presencia de ácido palmitoleico. Se crecieron cultivos de las cepas mencionadas en medio 7H9-G-T-Hig con el suplemento de ADS o PADS a 25 (izquierda) y 37°C (derecha). Se tomaron alícuotas de cada cultivo a los tiempos indicados y se midió la DO₆₀₀. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes.

6.2.2 Crecimiento en medio sólido

Para continuar con la caracterización fenotípica de la mutante en el gen *MSMEG_1886*, se analizó su crecimiento en medio sólido 7H9-G-Hig suplementado con ADS u OADS a 37°C. Las colonias obtenidas fueron observadas en lupa con aumento 2x (Figura 18).

Coincidentemente con los resultados obtenidos en medio líquido, se observó un defecto en el crecimiento en medio sólido en la cepa mutante, respecto de la cepa salvaje, tanto en la morfología como en el tamaño de las colonias.

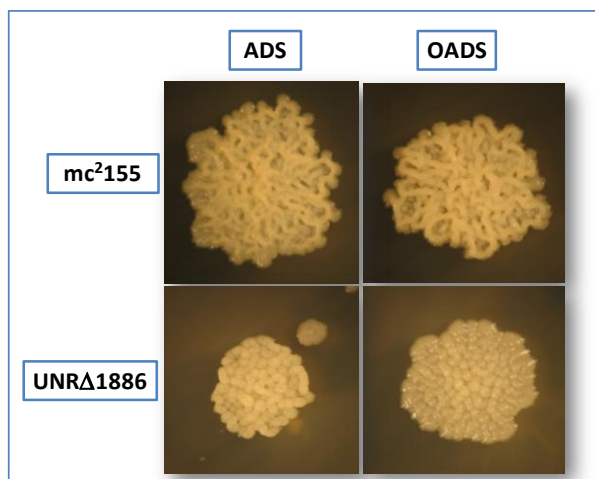


Figura 18. Crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* mc²155 y UNRA1886 en medio sólido. Las cepas de *M. smegmatis* mc²155 y UNRA1886 fueron crecidas en medio sólido 7H9-G-Hig, suplementado con ADS u OADS. Se sembraron diluciones de cultivos saturados para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 37°C por 5 días y las colonias fueron observadas y fotografiadas con una lupa Zeiss- Stemi 2000. Aumento 2x.

Las colonias de la cepa UNRA1886 son más pequeñas y compactas que las de la cepa mc²155. El defecto de tamaño fue parcialmente recuperado con el agregado de ácido oleico, pero la morfología permaneció alterada, siendo las colonias menos rugosas que las de la cepa salvaje. La cepa complementada mostró características coloniales idénticas a las de la cepa salvaje. Este defecto de crecimiento planteó el interrogante de si se vería afectada la composición de lípidos de membrana externa, tanto de ácidos micólicos, como de glicolípidos, quienes son responsables, en parte, de la morfología colonial en micobacterias. Además se analizó la composición de ácidos grasos de membrana plasmática mediante GC-MS.

6.2.3 Análisis de la composición lipídica

Para analizar la composición de lípidos de envoltura, se realizaron dos tipos de TLCs: de lípidos totales, que incluyen los lípidos extraíbles o no unidos covalentemente y de MEAGs y MEAMs obtenidos a partir de cultivos crecidos en presencia de ácido 1-[¹⁴C] acético y corridos en placas impregnadas con AgNO₃ (Figura 19).

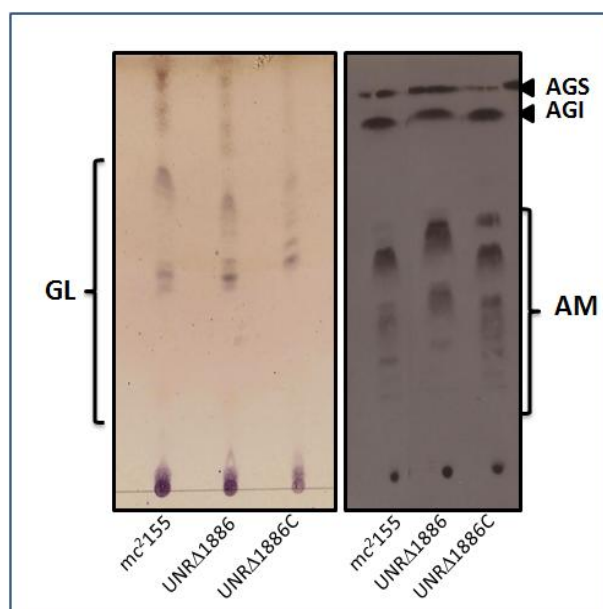


Figura 19. Perfil de glicolípidos y ácidos micólicos de las cepas de *M. smegmatis* mc²155, UNRA1886 y UNRA1886C. (a) TLCs de lípidos totales y (b) de MEAGs y MEAMs. Cultivos de las cepas mc²155, UNRA1886 y UNRA1886C fueron crecidos en medio 7H9-ADS-G-T-Hig en presencia (b) o ausencia (a) de ácido 1-[¹⁴C] acético. (a) Los lípidos fueron extraídos con mezclas sucesivas de metanol:cloroformo (2:1; 1:1 y 1:2), corridas una vez en placas de sílica G con cloroformo: metanol (9:1) y revelados con α -naftol en H₂SO₄. (b) Las células fueron sometidas a hidrólisis alcalina con TBAH durante 16 hs, los lípidos fueron metil-esterificados con CH₃I y extraídos con Cl₂CH₂ y éter etílico. Los metil-ésteres fueron corridos tres veces en placas de sílica G (impregnadas con AgNO₃ 10% p/v) con éter de petróleo:éter etílico (85:15 v/v). Se sembraron 40.000 CPM y fueron revelados en placas radiográficas X-OMAT (Kodak). GL: glicolípidos, AM: ácidos micólicos, AGS: ácidos grasos saturados, AGI: ácidos grasos insaturados.

No se observaron diferencias significativas entre los perfiles de corrida de los lípidos (tanto totales como MEAGs y MEAMs) de las cepas salvaje, mutante y complementada. Sin embargo, el hecho de que la cepa mutante revierte parcialmente su defecto de crecimiento con el agregado de AGI, sugiere como se mencionó anteriormente que el gen *MSMEG_1886* podría estar involucrado en la síntesis de dichos ácidos grasos. Teniendo en cuenta además que los ácidos grasos de cadena media (C16, C18 y C19), tanto saturados como insaturados, forman parte de la estructura de los glicolípidos, sería lógico pensar que la arquitectura de estas moléculas se vea afectada. Por ello, no se puede descartar la posibilidad de la existencia de diferencias más sutiles a nivel de composición que no sean visibles a simple vista. Sería interesante utilizar técnicas de identificación-cuantificación más precisas para definir si existen diferencias en este nivel.

A continuación, se analizó la composición de lípidos de cadena corta-media mediante GC-MS (Figura 20 y tabla 5).

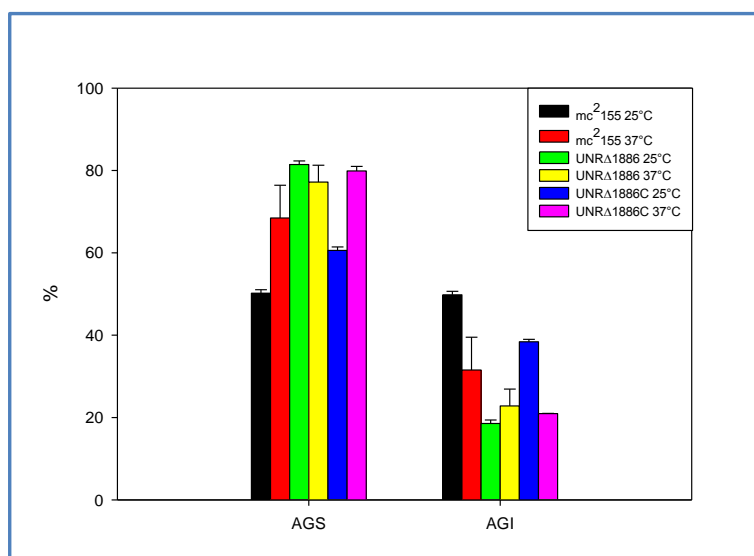


Figura 20. Proporción de AGS y AGI de las cepas de *M. smegmatis* mc²155, UNRA1886 y UNRA1886C a 25 y 37°C. Cultivos de las tres cepas fueron crecidos a 25 y 37°C hasta una D.O₆₀₀=1. Se obtuvieron los MEAGs y fueron cuantificados por GC-MS. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes.

En la figura 19 se observan las proporciones de AGS y AGI de las cepas salvaje, mutante y complementada a 25 y 37°C. A 25°C la proporción de AGI en la cepa UNRA1886 se ve claramente afectada, respecto de la cepa salvaje, siendo de 17,93%, mientras que en aquella es de 49%, lo que representa una disminución en la síntesis de AGI de un 63,4% en ausencia del gen *MSMEG_1886*. A 37°C el porcentaje de AGI en la cepa mutante es de 22,8% y en la cepa salvaje del 37,16%, por lo que la cepa mutante produce 38,8% menos AGI que la cepa salvaje. A 25°C la cepa complementada produce aproximadamente un 40% más AGI que la cepa mutante, representando este valor un 77,23% de la actividad de síntesis de la cepa salvaje. Concomitantemente con este descenso en los niveles de AGI en la cepa UNRA1886, se aprecia un aumento en las proporciones de AGS para esta cepa en relación a la cepa mc²155 de 50,19% a 81,45% a 25°C y de 68,43% a 77,16% a 37°C.

En la tabla 5 se detalla la composición de ácidos grasos tanto saturados como insaturados de las tres cepas estudiadas.

Ácido Graso	mc ² 155		UNRA1886		UNRA1886C	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
C16:0	26,05 ± 0,88	36,48 ± 2,39	39,61 ± 1,10	37,41 ± 1,51	36,23 ± 1,10	41,74 ± 1,05
C16:1 Δ7	3,15 ± 0,77	1,08 ± 0,31	0,67 ± 0,15	0,58 ± 0,23	0,52 ± 0,03	0,28 ± 0,03
C16:1 Δ9	1,18 ± 0,44	1,46 ± 0,15	0,14 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,01
C16:1 Δ10	6,61 ± 1,97	6 ± 0,59	0,09 ± 0,007	0,13 ± 0,01	2,5 ± 0,15	3,08 ± 0,12
C18:0	1,44 ± 0,77	1,92 ± 0,07	18,92 ± 0,49	17,97 ± 3,47	10,08 ± 0,11	16,18 ± 0,26
C18:1 Δ9	37,06 ± 1,28	27,49 ± 0,27	12,95 ± 2,9	16,08 ± 1,31	27,66 ± 0,93	15,50 ± 0,71
C18:0 CH ₃ Δ9	5,21 ± 1,67	9,63 ± 0,65	3,34 ± 0,69	2,15 ± 1,34	8,52 ± 0,69	4,30 ± 0,28
C24:0	13,10 ± 2,99	10,20 ± 1,70	13,74 ± 1,77	13,32 ± 2,93	5,62 ± 0,54	9,84 ± 0,23
C24:1 Δ15	1,08 ± 0,62	0,43 ± 0,17	2,77 ± 1,51	3,67 ± 4,01	4,69 ± 0,44	0,76 ± 0,06

Tabla 5. Composición de ácidos grasos de las cepas de *M. smegmatis* mc²155, UNRA1886 y UNRA1886C a 25 y 37°C. Cultivos de las tres cepas fueron crecidos a 25 y 37°C hasta una D.O₆₀₀=1. Se obtuvieron los MEAGs y fueron cuantificados por GC-MS. Se presentan los ácidos grasos mayoritarios. Se muestra un valor promedio de tres repeticiones independientes con su desvío estándar.

En la tabla 5 se observa un claro rearrreglo en las proporciones de ácidos grasos en la cepa mutante respecto de la cepa salvaje. El dato más relevante es la notable disminución en la proporción de los tres isómeros de C16:1 en la cepa mutante. La cepa UNRA1886 produce un 78,7% menos de C16:1Δ7, un 88,13% menos de C16:1Δ9 y un 98,64% menos de C16:1Δ10 que la cepa mc²155 a 25°C. A 37°C los porcentajes de disminución en la síntesis de los isómeros en posición Δ7, Δ9 y Δ10 son de 46,29%, 88,35% y 97,83%, respectivamente. En concordancia, UNRA1886 acumula una cantidad mayor de C16:0 a 25°C (52,05% más que la cepa salvaje). Sin embargo, a 37°C la cepa mutante solamente acumula un 2,5% más de C16:0 que la cepa salvaje. Por otra parte, también se registran cambios en el contenido de los ácidos esteárico-oleico. La cepa mutante produce un 1200% más ácido esteárico y un 65% menos de ácido oleico que la cepa salvaje a 25°C, mientras que a 37°C la diferencia cambia a un 41,5% de disminución en la síntesis de ácido oleico y un 835,9% de aumento en la producción de ácido esteárico. El ácido tuberculosteárico (C18:0 CH₃) disminuye un 35,9% a 25°C y un 77,7% a 37°C en la cepa UNRA1886. El ácido lignocérico (C24:0) no muestra cambios significativos entre las dos cepas, mientras que el ácido tetracosenoico (C24:1Δ15) aumenta un 175% a 25°C y un 753% a 37°C. En la cepa UNRA1886C se observa una complementación parcial de los niveles de ácidos grasos.

Los resultados obtenidos hasta el momento permiten proponer a Des1886 como una desaturasa de ácidos grasos, con especificidad aparente para cadenas carbonadas de 16 y 18 átomos de carbono. Sin embargo, la existencia de tres posibles desaturasas más que permanezcan activas, con seguridad genera un rearrreglo en el flujo de carbono que no permite afirmar con certeza la estéreo y regioselectividad de Des1886.

6.2.4 Análisis del efecto de isoxil (ISO) sobre el crecimiento.

Existe un reporte bibliográfico que propone a DesA3 de *M. tuberculosis* como blanco para la droga antituberculosa ISO. Esta hipótesis se basa en los siguientes hechos: a) la droga inhibe la síntesis de ácido oleico en esta especie (en general de ácidos grasos insaturados), además de la síntesis de ácidos micólicos, b) la sobreexpresión de DesA3 aumenta levemente la resistencia a esta droga y 3) el agregado de ácido oleico al medio de cultivo alivia ligeramente la toxicidad de ISO [190]. Si se considera que DesA3 es la enzima propuesta para la síntesis de ácido oleico [140], siendo este AGI el mayoritario y esencial, se concluye entonces que el blanco o uno de los blancos de ISO está representado por esta enzima. Por otra parte, *M. smegmatis* es naturalmente resistente a esta droga con una CIM ≥ 200 $\mu\text{g/mL}$ (mientras que la CIM para *M. tuberculosis* es de 0,5-1 $\mu\text{g/mL}$). En base a la homología de secuencia existente entre DesA3 y Des1886 que se describe en este trabajo, y teniendo en cuenta la evidente implicancia de esta proteína en la síntesis de AGI en *M. smegmatis*, se decidió evaluar el efecto de la droga ISO sobre la cepa mutante UNRA1886 en presencia y ausencia de ácidos grasos insaturados.

En la figura 21 se aprecia una disminución en la CIM de 4 veces (de 200 a 50 $\mu\text{g/mL}$) en la cepa UNRA1886, respecto de la cepa salvaje, en ausencia de AGI. En presencia de ácido oleico se recuperan, por un lado los valores de CIM de la cepa mc²155 y por otro el tamaño de las colonias. El agregado de ácido palmitoleico recupera solamente la capacidad de crecimiento de la cepa mutante en presencia de la droga hasta los 200 $\mu\text{g/mL}$ pero el tamaño de las colonias se reduce notablemente respecto del control sin droga.

Estos resultados muestran, por un lado que Des1886 es responsable en parte de la resistencia intrínseca de *M. smegmatis* a ISO, ya que en su ausencia la CIM disminuye notablemente; pero además surge la hipótesis de que no sería la única proteína que se une y titula esta droga, debido a que la bacteria es capaz de crecer aún en su ausencia hasta una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ISO. Esto plantea que existe una o más proteínas que pueda/n unir droga. Adicionalmente, el efecto de la droga revierte en presencia de AGI, o bien completamente con ácido oleico, o al menos en parte, con ácido palmitoleico. Entonces, en este caso, la droga se une a su/sus blanco/s pero el crecimiento

no se ve afectado debido el agregado exógeno de AGI que suple la falta de síntesis endógena, ya sea por inactivación de la/s proteína/s por efecto de la droga, por la delección de Des1886 o por la suma de los dos eventos.

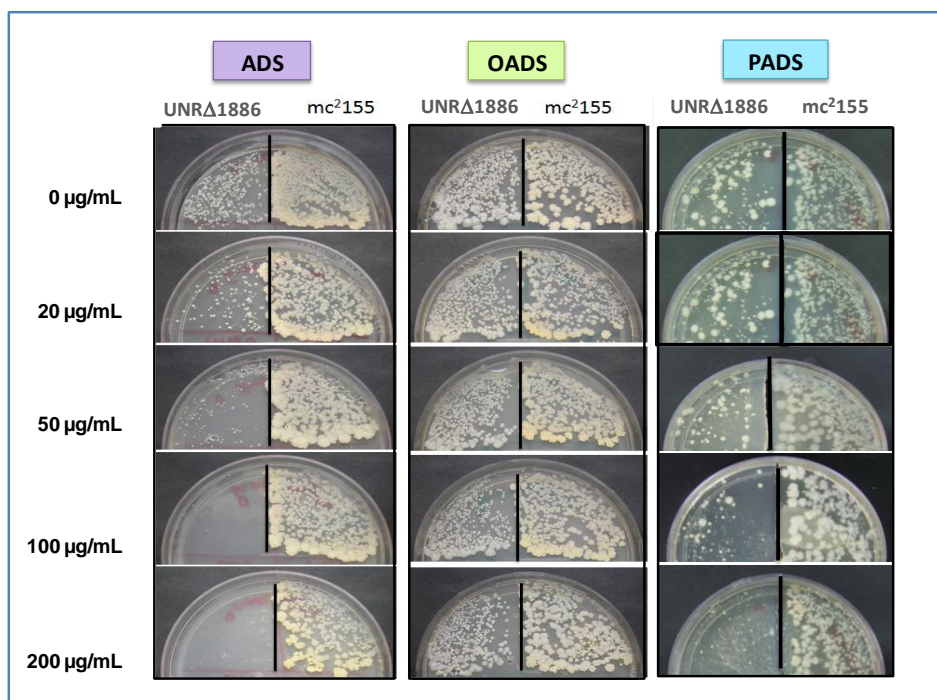


Figura 21. Efecto de la droga isoxil sobre el crecimiento de las cepas mc²155 y UNRA1886. Diluciones de cultivos saturados de las cepas mencionadas fueron sembradas en placas de medio sólido 7H9-G suplementadas con ADS, ácido oleico (OADS) o ácido palmitoleico (PADS) y en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de la droga (indicadas en la figura). Las placas fueron incubadas a 37°C por 5 días.

En trabajos previos realizados en este laboratorio [191], se evaluó el efecto de ISO en *M. tuberculosis* bajo condiciones de sobreexpresión de DesA3. No se observó una disminución significativa en la CIM de la cepa sobreexpresante en relación a la cepa salvaje. Por lo tanto DesA3 no sería blanco para esta droga en *M. tuberculosis* [191]. Para determinar el efecto de esta enzima sobre la sensibilidad-resistencia de ISO en *M. smegmatis* se complementó la cepa UNRA1886 con DesA3 de *M. tuberculosis*, bajo el control del promotor constitutivo *hsp60*. No se produjo un aumento en los valores de la CIM para esta cepa, como era esperable. Adicionalmente, la sobreexpresión de Des1886 en *M. tuberculosis* no modificó los niveles de sensibilidad a ISO en esta especie. Por otra parte, no se observaron efectos de ISO sobre la síntesis de ácidos micólicos ni en la cepa mc²155, ni en la cepa UNRA1886.

La delección en un gen relacionado con la síntesis de componentes de membrana, podría llevar a hipotetizar que la bacteria puede tener una permeabilidad aumentada a drogas en general y por lo tanto ser más sensible a todas ellas. Para determinar si el efecto de ISO está directamente relacionado con la ausencia de Des1886 y no con dicho proceso de permeabilidad incrementada, se realizaron ensayos de CIM para drogas con diferente mecanismo de acción (rifampicina (Rif), cristal violeta (CV), novobiocina (Nov) y tiacetazona (TAC)).

La figura 22 muestra los valores de CIM de las cepas salvaje y mutante para las drogas Rif, CV, Nov y TAC. La cepa mutante es más sensible a todas las drogas ensayadas. Se observan las siguientes disminuciones en los valores del CIM respecto de la cepa mc²155: Para CV de 16 a 4 µg/mL; para Rif de 64 a 32 µg/mL; para Nov de 128 a 32 µg/mL y para TAC disminuye de 200 a 20 µg/mL. Sin embargo la CIM para esta última droga revierte a los valores de la cepa salvaje con el agregado de ácido oleico. Por lo tanto se puede afirmar que existe una permeabilidad aumentada a drogas en general en la cepa mutante, pero también se puede observar que solamente la CIM para TAC revierte en presencia de ácido oleico y por lo tanto se puede estimar que tanto para esta droga, como para ISO, existe un mecanismo de acción relacionado con el metabolismo de AGI. Los valores de CIM de la cepa complementada, tanto para ISO como para el resto de las drogas ensayadas, corresponden a los valores de CIM de la cepa salvaje.

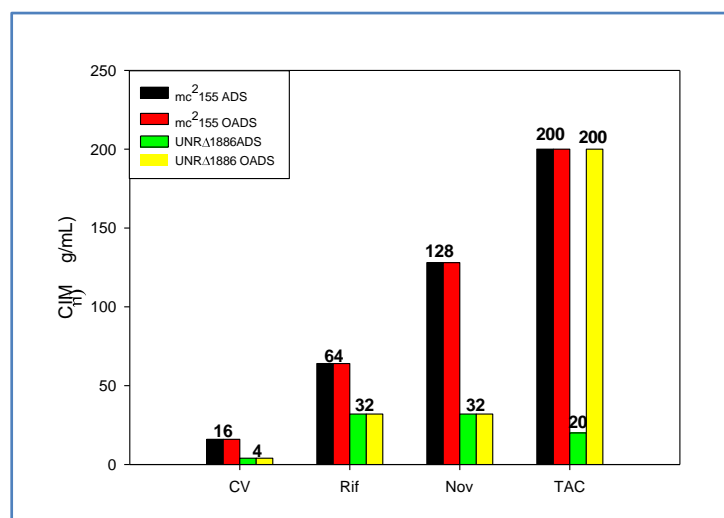


Figura 22. CIM de *M. smegmatis* a diferentes drogas. Diluciones de cultivos de las cepas mc²155 y UNRA1886 fueron sembradas en placas de medio sólido 7H9-G-T suplementadas con ADS u OADS y en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de las drogas indicadas en la figura. Las placas fueron incubadas a 37°C por 5 días. Se muestran los valores promedio de CIM de cada droga para cada cepa de tres repeticiones independientes. **CV**: cristal violeta, **Rif**: rifampicina, **Nov**: novobiocina, **TAC**: tiacetazona.

6.3 DISCUSIÓN

El crecimiento bacteriano requiere que una fracción considerable de las cadenas aciladas de los lípidos de membrana se encuentre en un estado desordenado. En la mayoría de las bacterias tal grado de desorden es provocado por AGI que actúan compensando la disposición ordenada y estrechamente empaquetada impartida por las cadenas lineales de AGS. Algunas bacterias sintetizan AGI mediante un proceso de desaturación aeróbica, mientras que otras lo hacen mediante una vía que no requiere oxígeno [192]. Otras, como *P. aeruginosa*, combinan los dos mecanismos [63]. Independientemente de la vía de síntesis de AGI, muchos organismos que son depletados de alguna enzima de esta vía, sólo pueden crecer en presencia de dichos productos. Ejemplos de ello son *E. coli* [193], *S. pneumoniae*, *S. mutans* [194], *S. cerevisiae* [128, 195], entre otros. Sin embargo, existen organismos que pueden sobrevivir en ausencia de estas enzimas si poseen vías alternativas de síntesis de AGI. Por ejemplo, *P. aeruginosa* puede crecer en aerobiosis sin el agregado de AGI en ausencia del gen *fabA* porque posee dos desaturasas aeróbicas alternativas, DesA y DesB, que sintetizan estos metabolitos en estas condiciones [70].

En este trabajo se demostró que *M. smegmatis* es capaz de crecer en ausencia de Des1886, aún a diferentes temperaturas sin el agregado de AGI. Estos resultados conllevan varias implicancias: a) por un lado que *MSMEG_1886* no es un gen esencial, pero sí importante para el crecimiento de *M. smegmatis*, sobre todo a bajas temperaturas, lo que queda demostrado por el marcado defecto de crecimiento que presenta fundamentalmente a 25°C; b) que el producto de *MSMEG_1886* está implicado en la vía de síntesis de AGI en esta especie, ya que el fenotipo mencionado en el punto anterior revierte parcialmente con el agregado de ácido oleico o palmitoleico y c) que la modificación de moléculas que forman parte de la estructura de membrana plasmática y membrana externa (ya sea de ácidos micólicos o de glicolípidos) afectan la morfología celular. En este sentido, la carencia de los productos de produciría una alteración morfológica. En relación a este último punto, las diferencias morfológicas persistentes de las colonias de la cepa mutante (a pesar de la restitución del tamaño) en presencia de ácido oleico, pueden ser debidas a las variaciones en la distribución de los ácidos grasos dentro de la célula. El flujo de metabolitos provenientes de la síntesis endógena probablemente difiera de aquel de los metabolitos incorporados por transporte. Entonces, si bien se le suministra exógenamente un AGI que la bacteria es capaz de utilizar, posiblemente no le sea posible acoplarlo a la ruta habitual de transporte hacia membrana.

En cuanto al rol de los glicolípidos en la fisiología de las micobacterias, no ha sido claramente establecido. Sin embargo, en *M. bovis*, por ejemplo, los PIMs y PI constituyen el 56%

de los fosfolípidos de pared y el 37% de membrana plasmática, por lo que han sido considerados componentes estructurales esenciales de la envoltura de las micobacterias [196]. Los AGI son moléculas constituyentes de los PIMs, por lo tanto, variaciones en las proporciones de AGI pueden llevar a modificaciones en la estructura de PIMs. Así, por ejemplo, ensayos de susceptibilidad a norfloxacin o cenodeoxicolato en cepas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* afectadas en la síntesis de PIM, muestran claramente la implicancia de estos glicolípidos en la permeabilidad de la envoltura celular tanto a moléculas hidrofóbicas como hidrofílicas [197-199]. Además, en cuanto a morfología, se ha demostrado que mutantes deficientes en *pimE* de *M. smegmatis* (involucrado en la transferencia de un residuo de manosa a un PIM en formación), presentan defectos en la formación de septos durante la división celular. Por lo que los PIMs tendrían un rol en la integridad de la membrana celular [198]. Por su parte, la modificación en la síntesis de ácidos micólicos también lleva a alteraciones en la morfología y en la permeabilidad. Por ejemplo, una mutante en el gen *MSMEG_4722*, encargado de la reducción final en la biosíntesis de ácidos micólicos, presenta una morfología alterada y acumulación de intermediarios de ácidos micólicos, así como una mayor permeabilidad a drogas lipofílicas [200].

El análisis de la composición lipídica mediante GC-MS que muestra la abrupta disminución en la cantidad de C16:1 y C18:1 (100% y 50%, respectivamente), confirma que Des1886 es una desaturasa de ácidos grasos con especificidad para cadenas carbonadas de 16 y 18 átomos de carbono. Teniendo en cuenta que aún ante la ausencia de *MSMEG_1886*, se sintetiza un remanente de ácido oleico, se confirma la presunción de que éste ácido graso proviene de dos vías de síntesis distintas: de la elongación de C16:1 Δ 7 pero también de la desaturación de C18:0 en posición Δ 9, llevada a cabo en parte por Des1886 y en parte por otra actividad desaturante. Es importante tener en cuenta que conforme disminuye el ácido oleico, se acumula ácido esteárico en esta cepa, lo que significa que existe precursor disponible para desaturar pero no actividad desaturante que lo convierta en ácido oleico. Por otra parte, si se analizan los porcentajes de los distintos isómeros de C16:1 a 25 y 37°C (tabla 5) se aprecia que el nivel de disminución de los isómeros Δ 9 y Δ 10 no varía con el cambio de temperatura y es muy cercano al 100%. Sin embargo, el isómero Δ 7 disminuye un 79% a 25°C y un 46% a 37°C, respecto de los porcentajes de la cepa salvaje. Esto supone que aún existe síntesis remanente de este isómero, y más aún, que disminuye a mayor temperatura, por lo que su síntesis está regulada. Entonces el escenario probable es el siguiente: a) que Des1886 sintetice uno de los dos isómeros, Δ 9 o Δ 10 y exista una actividad isomerasa que produzca el otro a partir del sintetizado en primera instancia; b) que el isómero restante sea sintetizado o bien por Des1886 (suponiendo en este caso que esta enzima posea una

regioselectividad flexible) o bien por otra actividad desaturante presente en la célula. Un ejemplo de este tipo de desaturasas con varias regioselectividades es FAT-2 de *Caenorhabditis elegans*, que puede desaturar sustratos de 14, 15, 16, 17 y 18 átomos de carbono de longitud y además en posiciones $\Delta 12$ y $\Delta 15$ [201]. Este nematodo posee además seis desaturasas. Tres $\Delta 9$ (FAT-5, FAT-6 y FAT-7), una $\Delta 15$ u ω -3 (FAT-1), una $\Delta 5$ (FAT-4) y una $\Delta 6$ (FAT-3) [202, 203]. Los hongos filamentosos *Fusarium moniliforme* y *Aspergillus nidulans*, poseen desaturasas bifuncionales $\Delta 12/\omega 3$. Estas enzimas desaturan C18:1 $\Delta 9$ en posición $\Delta 12$ para formar C18:2 $\Delta 9,12$. Adicionalmente, desaturan este producto en posición $\Delta 15$ para formar el ácido graso $\omega 3$ C18:3 $\Delta 9,12,15$ [204, 205]. Las cianobacterias también representan ejemplos de organismos con múltiples desaturasas que se clasifican en 4 grupos: 1) aquellas que introducen dobles enlaces en posición $\Delta 9$ de ácidos grasos esterificados a glicerolípidos, 2) las que introducen dobles enlaces en posiciones $\Delta 9$, $\Delta 12$ y $\Delta 15$ en cadenas C18 y $\Delta 9$ en cadenas de C16 esterificados a glicerolípidos, 3) aquellas que desaturan cadenas esterificadas de C18 en posiciones $\Delta 6$, $\Delta 9$ y $\Delta 12$ y 4) las que lo hacen en posiciones $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ y $\Delta 15$ en cadenas C18 esterificadas a glicerolípidos [206]. Se puede apreciar que las posibilidades de funcionalidad para Des1886 son variadas, pero no es posible asignar una función acotada y definida a esta enzima, ya que en su ausencia aún existen AGI remanentes, sintetizados por otra actividad enzimática.

Por lo expuesto anteriormente, es esperable que debido a las alteraciones morfológicas observadas, exista una modificación en el comportamiento de la cepa UNR $\Delta 1886$, en comparación con la cepa mc²155, frente a diferentes drogas. Como se presentó en los resultados, esta cepa es más sensible que la cepa salvaje a todas las drogas testeadas, a pesar de ser de naturaleza química diferente y tener diferentes blancos de acción. Se asume entonces que las alteraciones provocadas por la ausencia de MSMEG_1886 llevan a un aumento en la permeabilidad celular. Sin embargo, el comportamiento de UNR $\Delta 1886$ frente a TAC e ISO fue particular. En *M. tuberculosis* TAC actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos y provocando una consecuente acumulación de productos de FASI e ISO inhibe la síntesis de ácido oleico y ácidos micólicos [191]. Por su parte, en *M. smegmatis* mc²155, TAC produce una disminución en el contenido de C18:1 y C16:1 pero el efecto sobre el crecimiento no es relevante aún a bajas temperaturas (Mariana Doprado, resultados no publicados). No obstante lo expuesto, ambas drogas afectan el crecimiento de la cepa mutante UNR $\Delta 1886$, reduciendo la CIM 4 veces para ISO y 10 veces para TAC. Adicionalmente, el agregado de ácido oleico al medio de cultivo produce una reversión de la CIM para ambas drogas (pero no para el resto de las drogas ensayadas) a valores de la CIM de la cepa salvaje. Este resultado es esperable en el caso de TAC, ya que afecta la síntesis de C18:1 y C16:1 en la célula. Por lo tanto,

podría esperarse que en la cepa salvaje, ISO esté produciendo una alteración en las proporciones de AGI, al igual que TAC. Entonces en ausencia de *MSMEG_1886*, que parece tener un efecto titulador, los efectos de ambas drogas se manifiestan claramente en la reducción de los niveles de crecimiento debido a que el/los blanco/s restante/s queda/n disponible/s para ser bloqueados.

Por todo esto, si bien la cepa mutante presenta una mayor permeabilidad, las drogas ISO y TAC muestran un efecto específico y reversible por ácido oleico, que se puede relacionar con la vía metabólica afectada por la delección de *MSMEG_1886*. De esta manera ambas drogas actuarían en *M. smegmatis* mediante mecanismos que involucran la síntesis de lípidos como en el caso de *M. tuberculosis*, y más aún, se puede inferir que *MSMEG_1886* estaría relacionado con la resistencia a estas drogas en *M. smegmatis*, ya que en su ausencia la cepa mutante se vuelve más sensible. Es importante tener en cuenta que ISO no produce alteraciones sustanciales en la síntesis de ácidos micólicos, como sí ocurre en *M. tuberculosis*. Es por ello que se puede pensar en mecanismos de acción diferentes en ambas especies.

En la Figura 30, se presenta un posible modelo del modo de acción de ISO y TAC en *M. smegmatis*. En ausencia de drogas Des1886 sintetiza C16:1(en sus tres isómeros) y parte del C18:1. Cuando se adiciona ISO o TAC al medio, éstas drogas se unen a Des1886 bloqueando su actividad desaturasa, por lo que los niveles de C16:1 y C18:1 disminuyen pero la célula es capaz de crecer normalmente. Cuando se deleciona *MSMEG_1886*, desaparece la “proteína tituladora” de estas dos drogas, por lo tanto ISO y TAC se unen al resto de su/s blanco/s que pueden ser las tres desaturasas restantes o alguna otra proteína relacionada con la vía de síntesis de AGI y la CIM disminuye drásticamente.

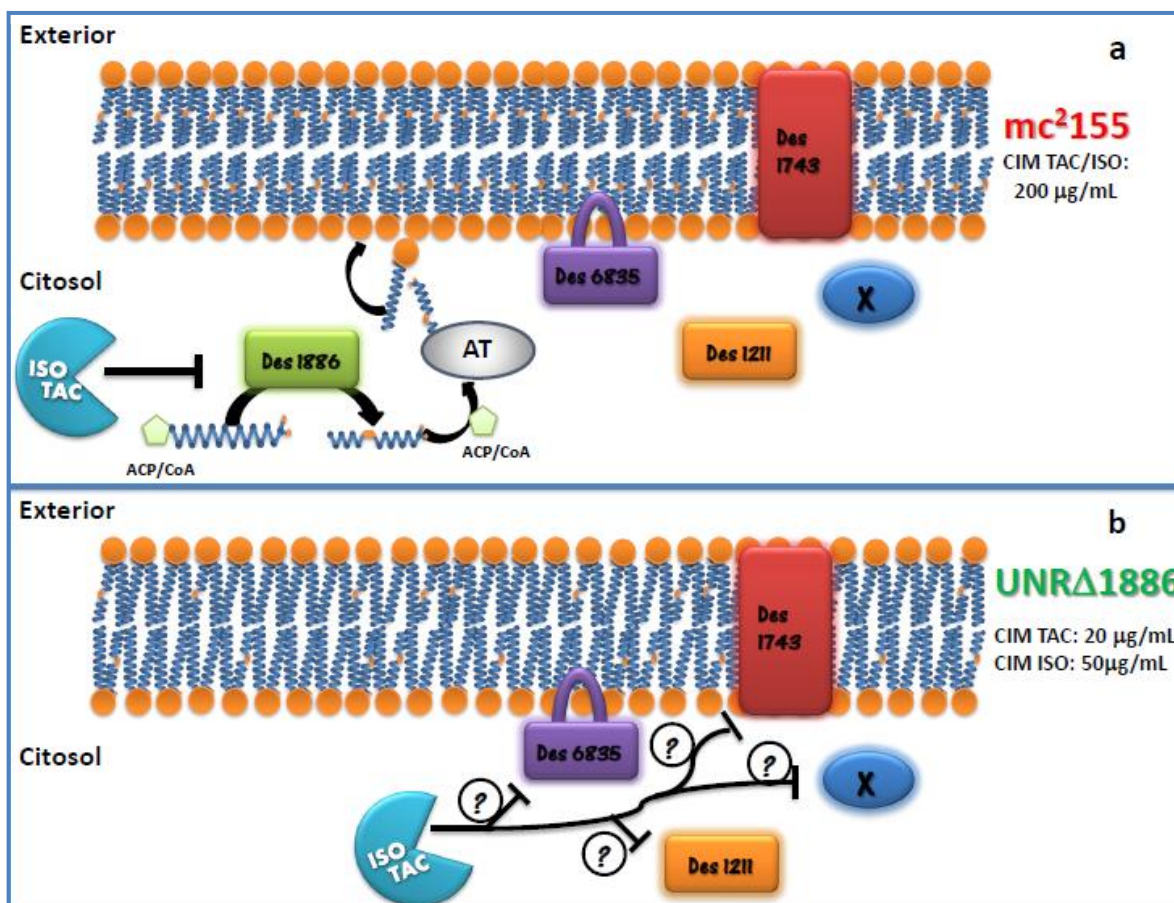


Figura 30. Modelo de acción propuesto para ISO y TAC en *M. smegmatis*. (a) En ausencia de drogas Des1886 sintetiza C16:1 y parte de C18:1. En presencia de ISO o TAC, éstas se unen a Des1886 y se reduce la síntesis de C16:1 y C18:1 pero la CIM es de 200 µg/mL. (b) En ausencia de Des1886, ISO y TAC se unen a una de las desaturasas restantes (Des1211, Des1743 o Des6835) o a otro blanco (X). Se reduce la CIM a 50 µg/mL para ISO y a 20 µg/mL para TAC. AT: acil-transferasa.

7. CAPÍTULO III

7.1 Caracterización funcional de Des1211, Des1743 y Des6835

Con el objetivo de determinar la actividad enzimática de Des1211, Des1743 y Des6835, se tuvieron en cuenta tres enfoques diferentes. Por un lado se quiso investigar la posible función desaturasa de las proteínas Des1211, Des1743 y Des6835 mediante ensayos de complementación de la cepa mutante UNRA1886. Por otra parte, se intentó deleccionar cada una de las proteínas mencionadas utilizando *recombineering*. Por último, se llevaron a cabo experimentos de silenciamiento de dichos genes a través de la construcción de ARNm antisentido para cada uno de ellos.

Para comenzar a elucidar la función de dichas proteínas se realizó un análisis de la estructura de las mismas a través del uso de herramientas bioinformáticas y la comparación con proteínas descritas en la bibliografía.

7.1.1 Características estructurales de las desaturasas de *M. smegmatis*.

La mayoría de las acil-CoA y acil-lípido desaturasas de membrana contienen entre 300 y 350 aminoácidos de longitud [207, 208]. Son proteínas hidrofóbicas y poseen, en su mayoría cuatro dominios transmembrana [78, 104]. En este grupo de enzimas la unión al complejo di-hierro es llevada a cabo por las tres cajas de histidina, cuya estructura puede ser $H(X)_{3-4}H$, $H(X)_{2-3}HH$ ó $H/Q(X)_{2-3}HH$ [66]. Las acil-CoA desaturasas, aceptan electrones de un sistema de transporte de electrones compuesto por citocromo b_5 y una citocromo b_5 reductasa dependiente de NADH. Se han descrito actividades desaturantes $\Delta 5$, $\Delta 6$ y $\Delta 9$ [209-211], pero solamente se han clonado y caracterizado genes de estearoil-CoA desaturasas [207, 208, 211-214]. Por su parte, las acil-lípido desaturasas de cianobacterias y cloroplastos, utilizan ferredoxina como donador de electrones [215, 216]. Estas desaturasas introducen dobles enlaces en posiciones $\Delta 6$ [217], $\Delta 9$ [218, 219], $\Delta 12$ [219, 220] y $\omega 3$ [221].

Las desaturasas de las micobacterias en general, y de *M. smegmatis* en particular, poseen características estructurales un tanto diferentes de las desaturasas descritas en la bibliografía. Esto

justifica la falta de homología fuera de las desaturasas del género. De acuerdo a un análisis bioinformático, Des1211 posee 363 aminoácidos, Des1743 posee 382, Des1886 posee 418 aminoácidos y Des6835 posee 464 aminoácidos de longitud. En cuanto a localización sub-celular, Des1211 y Des 1886 son proteínas solubles, mientras que Des1743 posee cuatro segmentos transmembrana y Des6835 posee solamente un segmento transmembrana. Des1743 tiene un dominio N-terminal de 53 aminoácidos, siendo más extenso que los descriptos para desaturasas de membrana. Ninguna de las desaturasas posee dominio de unión a citocromo b_5 , lo cual es lógico porque éste no se encuentra codificado en el genoma de *M. smegmatis*. Es probable que el donador de electrones sean las ferredoxinas. Por último la distancia entre la primera y segunda cajas de histidina es conservada y es de 30 aminoácidos, mientras que la distancia entre la segunda y tercera caja es variable entre las desaturasas. DesA3 de *M. tuberculosis* H37Rv es una proteína de 427 aminoácidos con un solo dominio transmembrana y una distancia de 30 aminoácidos entre la primera y la segunda cajas de histidina. Existen reportes contradictorios en relación a si DesA3 es una desaturasa soluble o de membrana. Un grupo de autores determinan actividad estearoil- $\Delta 9$ en fracción citosólica [190], mientras que otro la encuentra en fracción de membranas [140]. Sin embargo, estos dos grupos coinciden en que DesA3 posee actividad $\Delta 9$ estearoil-desaturasa [140, 190] pero también es capaz de desaturar C16:0 en posición $\Delta 9$ [140]. Además utiliza como cofactores NADPH y FAD [140]. Es interesante notar que no puede descartarse que DesA3 posea otras actividades desaturantes, ya que solamente se ha determinado su actividad con dos sustratos específicos (C18:0 y C16:0).

7.1.2 Complementación funcional de *M. smegmatis* UNRA1886 con las desaturasas Des1211, Des1743 y Des6835.

Para los ensayos de complementación funcional en la cepa mutante UNRA1886, se clonaron las desaturasas Des1211, Des1743 y Des6835 en el vector de expresión pLAM12, que contiene un promotor inducible por acetamida. Se obtuvieron así las cepas UNRA1886-pLAM, UNRA1886-C1211, UNRA1886-C1743 y UNRA1886-C6835, conteniendo el vector vacío o el vector con las desaturasas Des1211, Des1743 y Des6835, respectivamente. Como control se utilizó la cepa salvaje complementada con cada una de las desaturasas. Así se originaron las cepas mc²155-pLAM, mc²155-C1211, mc²155-C1743 y mc²155-C6835. Estas cepas fueron crecidas en medio 7H9-Succ-T-Kan con o sin acetamida a 25 y 37°C (Figuras 23 y 24).

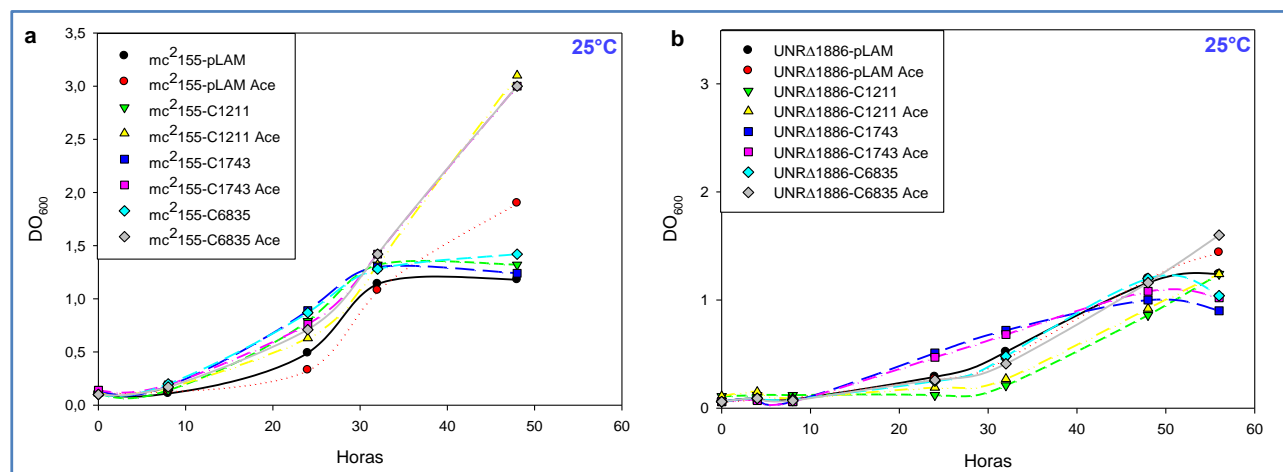


Figura 23. Curvas de crecimiento de las cepas mc^2155 y UNRA1886 complementadas con las desaturasas Des1211, Des1743 y Des6835 a 25°C. Cultivos de las cepas mc^2155 -pLAM, mc^2155 -C1211, mc^2155 -C1743, mc^2155 -C6835 (a), UNRA1886-pLAM, UNRA1886-C1211, UNRA1886-C1743 y UNRA1886-C6835 (b) fueron crecidas a 25°C en medio 7H9-Succ-T-Kan hasta una $DO_{600}=0,1$. En este punto cada cultivo se dividió en dos alícuotas y a una de ellas se le adicionó acetamida SIGMA 0,2% (v/v). Se continuó la incubación y se determinó la DO_{600} en los tiempos indicados en la figura. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes. **Ace:** acetamida

En la figura 23 se observa el crecimiento de las cepas salvaje y mutante complementadas con las tres desaturasas de *M. smegmatis* a 25°C en presencia y ausencia del inductor acetamida. Para la cepa salvaje no se observan diferencias significativas en los niveles de crecimiento en ninguna condición, lo cual significa que la sobreexpresión de las desaturasas no provoca un efecto de toxicidad en esta cepa. Para la cepa UNRA1886 la sobreexpresión de las desaturasas Des1211 y Des6835 no produce variaciones en el crecimiento, mientras que la sobreexpresión de Des1743 mejora sutilmente el crecimiento de esta cepa mutante entre las 15 y las 38 horas. A las 24 hs de crecimiento la DO_{600} de la cepa UNRA1886-C1743 es del doble de la correspondiente a la cepa con el vector vacío. A continuación se analizó el crecimiento de las cepas anteriores a 37°C (Figura 24).

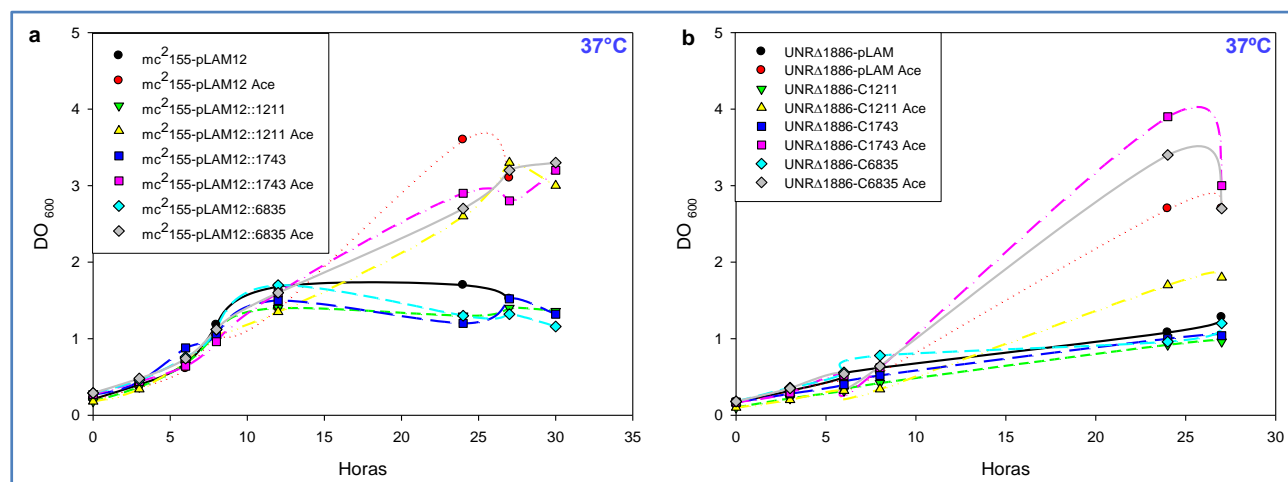


Figura 24. Curvas de crecimiento de las cepas *mc*²155 y UNRA1886 complementadas con las desaturasas Des1211, Des1743 y Des6835 a 37°C. Cultivos de las cepas *mc*²155-pLAM, *mc*²155-C1211, *mc*²155-C1743, *mc*²155-C6835 (a), UNRA1886-pLAM, UNRA1886-C1211, UNRA1886-C1743 y UNRA1886-C6835 (b) fueron crecidas a 37°C en medio 7H9-Succ-T-Kan hasta una DO₆₀₀=0,1. En este punto cada cultivo se dividió en dos alícuotas y a una de ellas se le adicionó acetamida SIGMA 0,2% (v/v). Se continuó la incubación y se determinó la DO₆₀₀ en los tiempos indicados en la figura. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes. **Ace:** acetamida

La cepa salvaje y sus respectivas complementaciones no muestran diferencias significativas de crecimiento a 37°C. Lo mismo sucede con la cepa UNRA1886 y sus complementaciones. Por ello se puede decir que, al menos a nivel de crecimiento, ninguna de las desaturasas sobreexpresadas es capaz de complementar a la cepa mutante en *MSMEG_1886*. En la figura 24 también se observa que la presencia de acetamida en el medio de cultivo produce un incremento en la DO₆₀₀ de las cepas inducidas a partir de las 15-18 hs aproximadamente. Este fenómeno se debe a que la fuente de carbono utilizada para el medio de cultivo es succinato. A medida que éste se consume, la bacteria es capaz de utilizar la acetamida (que se va agregando cada 24 hs) como fuente de carbono y seguir creciendo, mientras que los cultivos sin acetamida muestran un arresto en el crecimiento por agotamiento de la fuente de carbono.

Si bien a nivel de crecimiento no se observaron modificaciones significativas con la sobreexpresión de ninguna de las desaturasas, se decidió evaluar la composición lipídica de todas las cepas mencionadas mediante GC-MS. En la figura 25 se observa el perfil de lípidos de todas las cepas estudiadas a 37°C en presencia de acetamida (los valores de los cultivos crecidos sin

acetamida son idénticos a los que se presentan en la figura, por lo tanto para simplificar el análisis se muestran solamente los datos de cultivos inducidos).

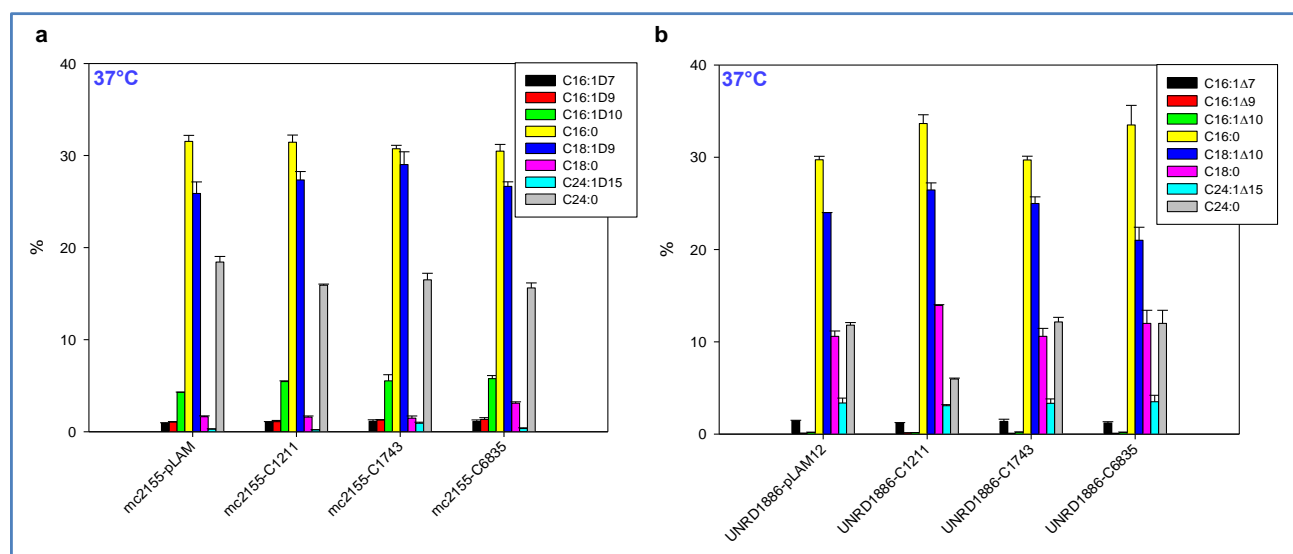


Figura 25. Composición de ácidos grasos de las cepas de *mc*²¹⁵⁵ (a) y *UNRA*1886 (b) complementadas con las desaturasas *Des*1211, *Des*1743 y *Des*6835 a 37°C. Cultivos de las cepas mencionadas fueron crecidos en medio 7H9-Succ-Trit-Ace 0,2% a 37°C hasta una D.O₆₀₀=1. Se obtuvieron los MEAGs y fueron cuantificados por GC-MS. Se presentan los ácidos grasos mayoritarios. Se muestra un valor promedio de tres repeticiones independientes.

No se observaron diferencias significativas entre los perfiles lipídicos de las cepas de *mc*²¹⁵⁵ y *UNRA*1886 conteniendo el vector vacío o las desaturasas *Des*1211, *Des*1743 y *Des*6835. Este resultado, junto con el hecho de que no se registraron diferencias en el crecimiento, genera la pregunta de si estas proteínas realmente se están expresando. Desafortunadamente, no contamos con las herramientas para determinar por *western blot* dicha sobreexpresión. Se analizaron los extractos proteicos de todas las cepas con y sin acetamida mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida teñidos con *coomassie blue* y no se observó la aparición de ninguna banda diferencial correspondiente a los pesos moleculares de las proteínas en estudio. Por lo tanto, no pudimos asignar una función biológica a estas proteínas mediante la metodología empleada.

7.2 Construcción de mutantes deleciones

Ante la falta de evidencias contundentes a cerca de la función de las proteínas *Des*1211, *Des*1743 y *Des*6835 arrojadas por los ensayos de sobreexpresión, se decidió construir mutantes deleciones para los genes que codifican las tres proteínas. Además se intentó construir una mutante nula de *M. tuberculosis* en *DesA3* para definir la actividad enzimática de esta proteína pero

también para tener un entorno genético sin desaturasas donde expresar los homólogos de *M. smegmatis*. Se llevó a cabo la misma metodología empleada para delecionar el gen *MSMEG_1886*, pero no fue posible hasta el momento la obtención de clones resistentes al antibiótico utilizado para la selección que tuvieran las delecciones esperadas.

7.3 Construcción de ARNm antisentido

Debido a la falla en la construcción de las mutantes delecionales, se llevó a cabo una estrategia alternativa que consistió en la construcción de ARNm antisentido para cada gen. Para tal fin, se utilizó el vector pML2031. Este vector contiene un promotor inducible por nitrilos, en particular se utiliza el inductor isovaleronitrilo (IVN). Se clonaron los genes de las desaturasas en sentido opuesto al de transcripción habitual bajo el control del promotor mencionado. Los vectores obtenidos fueron transformados en las cepas mc²155 y UNRA1886 y las cepas obtenidas se nombraron WT-pML, WT-pML1211AS, WT-pML1743AS, WT-pML6835AS, UNRA-pML, UNRA-pML1211AS y UNRA-pML1743AS. Un punto a tener en cuenta es que el vector pML2031 contiene un *cassette* de resistencia a higromicina. Debido a que la cepa UNRA1886 contiene una resistencia cromosómica a ese antibiótico, se clonó en el vector un *cassette* de resistencia a kanamicina. Hasta ahora, no fue posible construir el gen antisentido de *MSMEG_6835* debido a incompatibilidad de los sitios de restricción utilizados para clonar este *cassette* de resistencia. En la figura 26 se analiza el crecimiento en medio líquido de la cepa salvaje mc²155 conteniendo el vector vacío o los ARNm antisentido construidos a 25, 37 y 42°C.

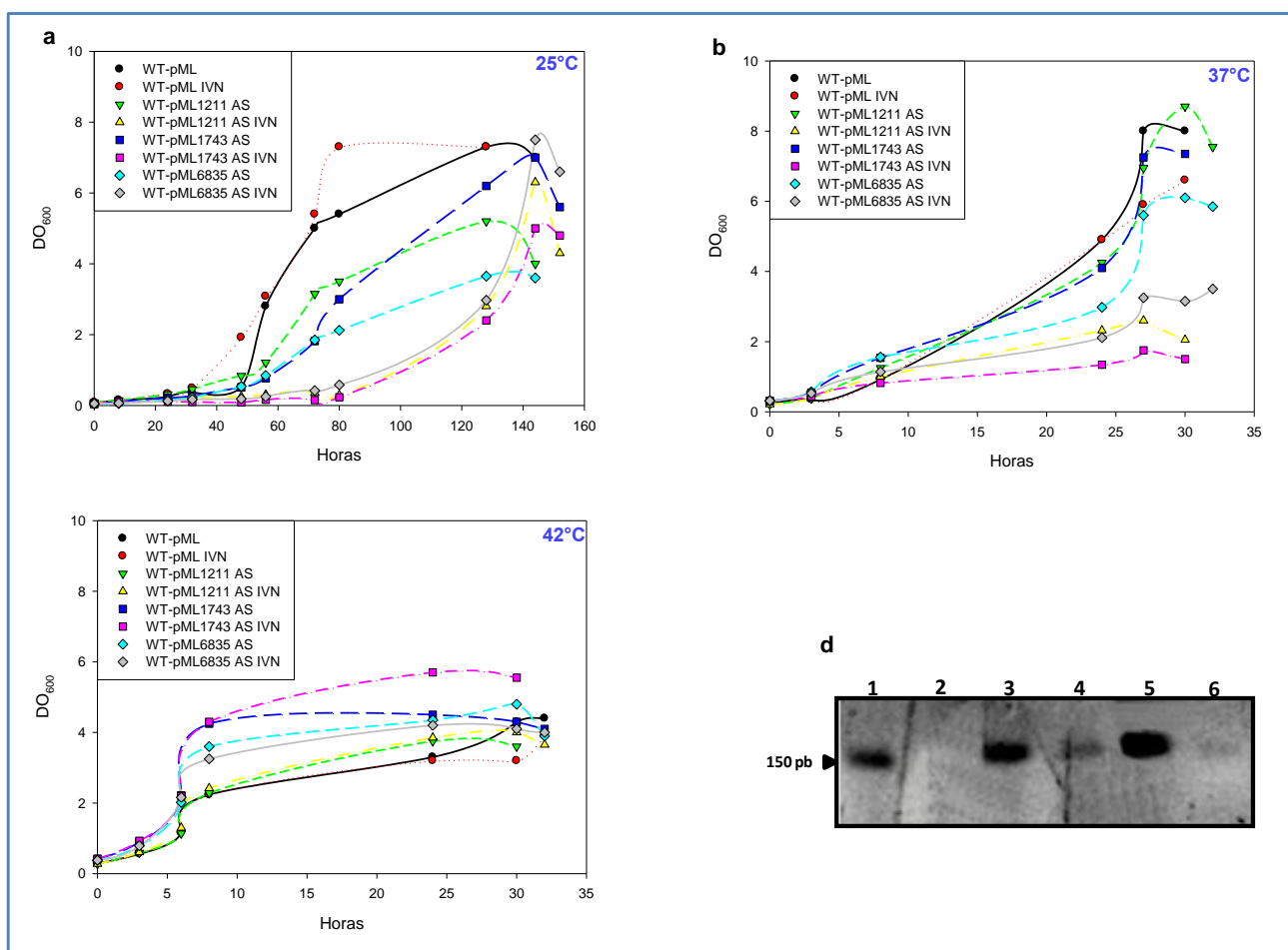


Figura 26. Curvas de crecimiento de la cepa *mc*²¹⁵⁵ conteniendo los ARNm antisentido de las proteínas Des1211, Des1743 y Des6835. Cultivos de las cepas WT-pML, WT-pML1211AS, WT-pML1743AS y WT-pML6835AS fueron crecidos en medio 7H9-ADS-G-T-Hig a 25°C (a), 37°C (b) y 42°C (c) hasta una DO₆₀₀=0,1. En este punto se dividieron en dos alícuotas y a una de ellas se le adicionó isovaleronitrilo (IVN) 1 µM. Se continuó con la incubación, se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se determinó la DO₆₀₀. (d) RT-PCR confirmando el silenciamiento de los genes *MSMEG_1211*, *MSMEG_1743* y *MSMEG_6835* en la cepa *mc*2155. Se utilizó como molde cADN de cultivos de las cepas WT-pML1211AS, WT-pML1743AS y WT-pML6835AS en presencia y ausencia de IVN y se amplificó utilizando oligonucleótidos que hibridan en la zona codificante 3' de cada gen. 1 y 2: Productos de amplificación del cADN del gen *MSMEG_1211* en ausencia y presencia de IVN, respectivamente; 3 y 4: Productos de amplificación del cADN del gen *MSMEG_1743* en ausencia y presencia de IVN, respectivamente; 5 y 6: Productos de amplificación del cADN del gen *MSMEG_6835* en ausencia y presencia de IVN, respectivamente.

Se observa una disminución en el crecimiento de las cepas que contienen los ARNm antisentido en presencia del inductor, tanto a 25 como a 37°C. Por su parte, la cepa que contiene el vector vacío (WT-pML) no muestra modificaciones en su crecimiento independientemente de la presencia del inductor a ninguna de las temperaturas ensayadas. A 42°C el crecimiento de las cepas no se encuentra afectado por la sobreexpresión de los ARNm antisentido, ni en presencia ni en ausencia de INV. Con estos resultados se puede deducir que el efecto observado está directamente relacionado con el efecto de sobreexpresión de los ARNm antisentido y a su vez que este efecto se produce específicamente a 25 y a 37°C, pero no a 42°C, por lo cual, se puede descartar un efecto de toxicidad producido por la sobreexpresión.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de los ARNm antisentido en la cepa mutante, se realizaron curvas de crecimiento a 25 y 37°C de las cepas conteniendo los vectores con los genes clonados en sentido inverso. Se observó el mismo efecto encontrado en la cepa salvaje. El crecimiento disminuye como consecuencia de la expresión de los ARNm antisentido en presencia de IVN tanto a 25 como a 37°C (figura 27).

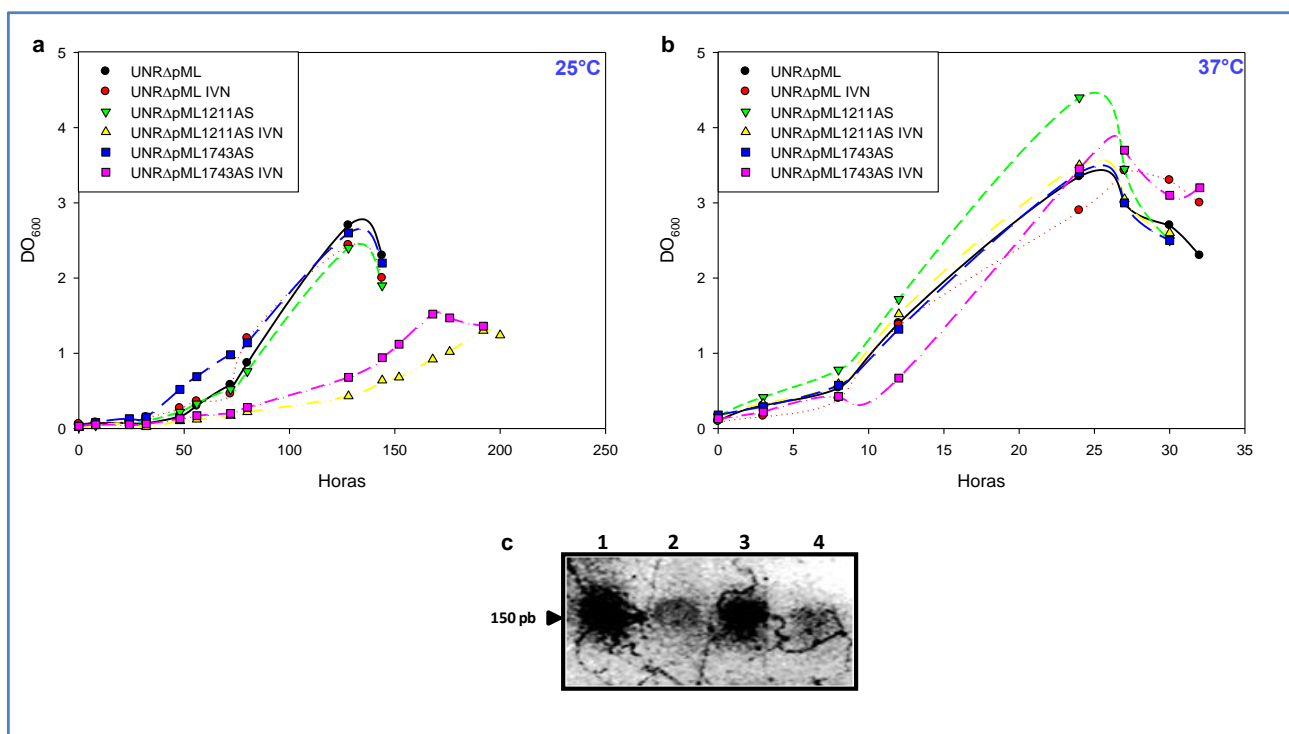


Figura 27. Curvas de crecimiento de la cepa UNRA1886 conteniendo los ARNm antisentido de las proteínas Des1211 y Des1743. Cultivos de las cepas UNRA-pML, UNRA -pML1211AS y UNRA -pML1743AS fueron crecidos en medio 7H9-ADS-G-T-Hig a 25°C (a) y 37°C (b) hasta una $DO_{600}=0,1$. En este punto se dividieron en dos alícuotas y a una de ellas se le adicionó isovaleronitrilo (IVN) 1 μ M. Se continuó con la incubación, se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se determinó la DO_{600} . (c) RT-PCR confirmando el silenciamiento de los genes *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743* en la cepa UNRA1886. Se utilizó como molde cADN de cultivos de las cepas UNRA-pML1211AS y UNRA -pML1743AS en presencia y ausencia de IVN y se amplificó utilizando oligonucleótidos que hibridan en la zona codificante 3' de cada gen. 1 y 2: Productos de amplificación del cADN del gen *MSMEG_1211* en ausencia y presencia de IVN, respectivamente; 3 y 4: Productos de amplificación del cADN del gen *MSMEG_1743* en ausencia y presencia de IVN, respectivamente;

Como ocurre con la cepa salvaje, el defecto en el crecimiento de la cepa mutante en presencia de IVN es más acentuado a 25°C que a 37°C. Esto puede deberse a que probablemente estos genes sean necesarios a baja temperatura, así como lo es Des1886 y si son silenciados, la bacteria crece con dificultad.

Para confirmar que se estuviera produciendo el silenciamiento de los genes mencionados, se extrajo ARN total de los cultivos de las cepas inducidas y sin inducir a 37°C, se retrotranscribió y se realizó una PCR utilizando como molde los cADN obtenidos, con oligonucleótidos que hibridan dentro de la zona codificante de cada gen. Se obtuvo una disminución en los niveles de transcripto de los genes *MSMEG_1211*, *MSMEG_1743* y *MSMEG_6835* en las cepas inducidas con IVN (Figura 26 d). Lo mismo sucedió con los niveles de transcripto que se obtuvieron para la cepa mutante UNRA1886 conteniendo los ARNm antisentido de los genes *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743*. Se observó una reducción en los mismos en presencia de IVN (Figura 27 c).

Para profundizar el estudio del efecto de la expresión de los ARNm antisentido, se evaluó la composición de lípidos de las cepas mc²155 y UNRA1886 conteniendo el vector vacío o los genes antisentido de *MSMEG_1211*, *MSMEG_1743* y *MSMEG_6835*. Se extrajeron los MEAGs de cultivos de las cepas anteriores crecidas a 25 y 37°C con o sin el agregado del inductor IVN y éstos se analizaron por GC-MS (Figuras 28 y 29).

En la figura 28 se aprecia la composición de lípidos de cadena corta-media de la cepa salvaje expresando los ARNm antisentido a 25 y 37°C. A 25°C no se observan diferencias significativas entre el control con el plásmido vacío y las cepas que expresan los ARNm antisentido, ni en presencia ni en ausencia de IVN (Figura 28 a), excepto para los ácidos oleico (C18:1) y nervónico (C24:1) que disminuyen un 24% y un 100%, respectivamente en la cepa que sobreexpresa el ARNm antisentido de *MSMEG_1743*. A 37°C, se produce un aumento al doble en el contenido de ácido oleico en presencia de IVN de un 10,93% a 21,36% para la cepa WT-pML1211AS y de un 12,40% a 24,9% para la cepa WT-pML1743AS. En el caso de la cepa WT-pML6835AS se aprecia una variación menor de 17,24% a 21,22%. Por su parte se observa un comportamiento opuesto para el control con el plásmido vacío, en el cual este ácido graso disminuye de 20,78% a 15,49% en presencia de IVN (Figura 28 b). Es importante destacar que no se ven significativamente afectados los niveles de ningún isómero de C16:1. Al igual que a 25°C, el ácido nervónico se reduce en un 100% en la cepa WT-pML1743AS en presencia de IVN.

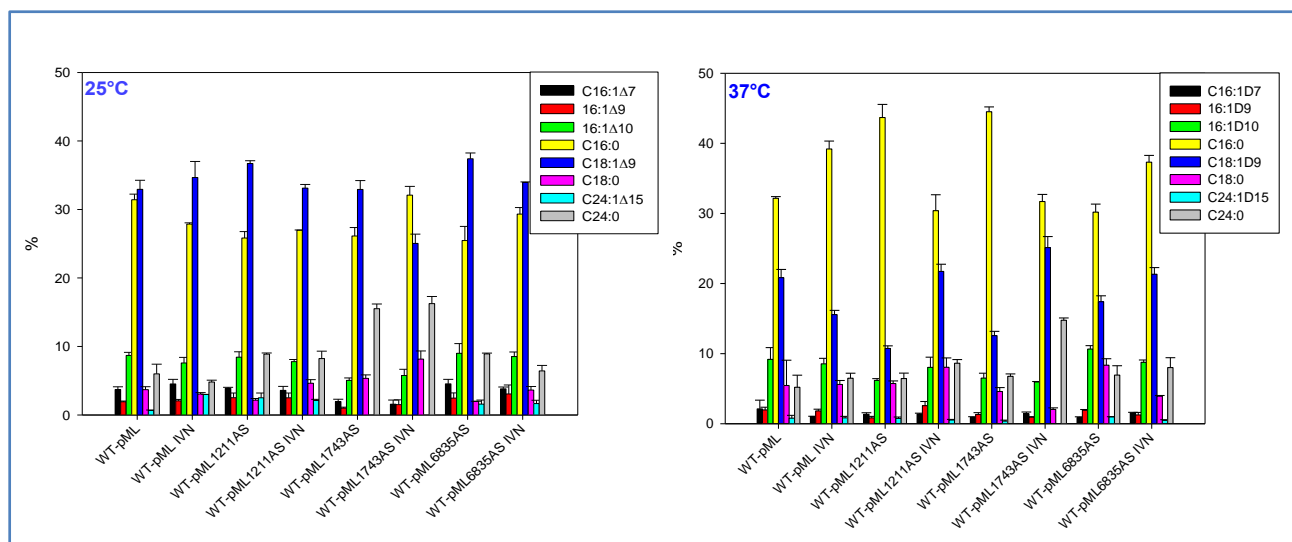


Figura 28. Composición de ácidos grasos de cadena corta-media de la cepa mc2155 expresando los ARNm antisentido de los genes *MSMEG_1211*, *MSMEG_1743* y *MSMEG_6835*. Cultivos de las cepas indicadas fueron crecidos en medio 7H9-ADS-G-T-Hig a 25 (a) y 37°C (b) hasta una $DO_{600}=0,1$. En este punto se dividieron en dos alícuotas y a una de ellas se le adicionó isovaleronitrilo (IVN) 1 μ M. Se incubaron 16 hs a las temperaturas indicadas y se obtuvieron los MEAGs que fueron analizados por GC-MS. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes.

En el caso de la cepa UNRA1886, la expresión de los ARNm antisentido, tanto de Des1211 como de Des1743 provoca una acumulación de cadenas carbonadas más cortas que las encontradas habitualmente y con metilaciones en su cadena a las dos temperaturas ensayadas. Particularmente se observa la aparición de C15:0 y C15:0 aCH₃ en las cepas UNRApML1211AS y UNRApML1743AS tanto en presencia como en ausencia de IVN, pero no se observan en la cepa conteniendo el plásmido vacío. Esto significa que aún en ausencia del inductor existe expresión basal de los ARNm antisentido. A 25°C el efecto es más pronunciado, acumulándose mayor cantidad de estos ácidos grasos (Figura 29 a) que a 37°C (Figura 29 b). Además se aprecia una disminución en la proporción de C16:0 del 40,9% en las dos cepas expresando los ARNm antisentido. También se reduce el porcentaje de C18:1 del 66,6% y del 71,4% para las cepas UNRApML1211AS y UNRApML1743AS, pero sin aumento de C18:0. Probablemente esto último se deba a la carencia de desaturación de C16:0. Entonces el C16:1 que se debería formar no es elongado a C18:1. Los porcentajes de reducción de C16:1 son: 81% del isómero $\Delta 7$ respecto de la cepa con el vector vacío para los ARNm antisentido de Des1211 y Des1743; 93% y 76,6% para el isómero $\Delta 9$ en las cepas que expresan los ARNm antisentido de *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743*; 73,3% y 56,6% para el

isómero $\Delta 10$. Adicionalmente, a 25°C se reduce en un 61,2% y 26,6% respecto de la cepa UNRD Δ pML el porcentaje de C24:1 para las cepas UNRD Δ pML1211AS y UNRD Δ pML1743AS, respectivamente, pero este ácido graso no se modifica notablemente a 37°C.

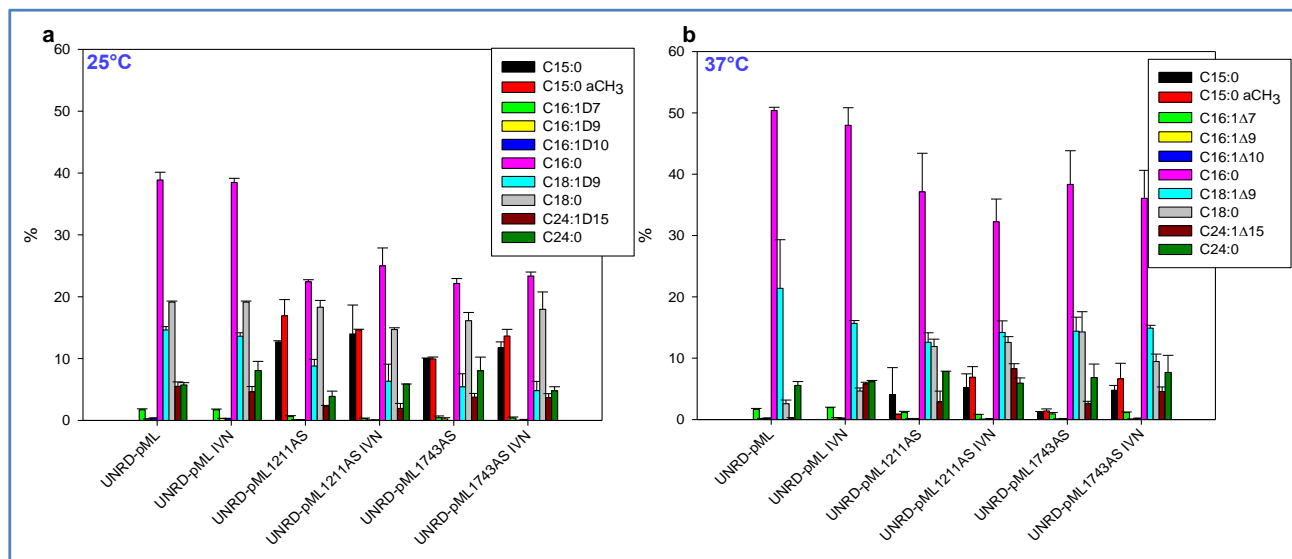


Figura 29. Composición de ácidos grasos de cadena corta-media de la cepa UNRD1886 expresando los ARNm antisentido de los genes *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743*. Cultivos de las cepas indicadas fueron crecidos en medio 7H9-ADS-G-T-Kan a 25 (a) y 37°C (b) hasta una $DO_{600}=0,1$. En este punto se dividieron en dos alícuotas y a una de ellas se le adicionó isovaleronitrilo (IVN) 1 μ M. Se incubaron 16 hs a las temperaturas indicadas y se obtuvieron los MEAGs que fueron analizados por GC-MS. Se muestra un promedio de tres repeticiones independientes.

Los datos obtenidos pueden ser analizados en función de la presencia o ausencia de Des1886 pero también en relación al efecto de la temperatura. El análisis se complejiza al tratar de integrar los dos factores conjuntamente. Por ello, los resultados obtenidos hasta el momento no han permitido elucidar con claridad la función biológica de Des1211, Des1743 y Des6835. Si bien se observa un silenciamiento de los genes, éste es parcial y por lo tanto los resultados son confusos y no arrojan luz sobre las actividades específicas de estas proteínas. Sin embargo, se pueden establecer ciertos patrones de modificación en la composición lipídica y claros efectos en el crecimiento producto de la expresión de los ARNm antisentido de cada desaturasa. Para profundizar el entendimiento de estas enzimas es necesario obtener cepas deleciones para cada gen para poder analizar los cambios fisiológicos que se produzcan.

7.4 DISCUSIÓN

En base a la secuencia aminoacídica, existen dos grupos de desaturasas no relacionadas (aunque comparten ciertas similitudes como los cofactores que utilizan y la estereoquímica de la remoción de hidrógeno). El primer grupo está representado por desaturasas solubles que utilizan ACP como portador de la cadena acilada y se encuentran en plastidios de plantas. Los electrones requeridos para la desaturación provienen de ferredoxina y deben llegar al centro di-hierro de la proteína que se encuentra protegido por una α -hélice. Los aminoácidos involucrados en la unión del complejo di-hierro forman dos motivos característicos D/EXXH [222, 223]. El segundo grupo está compuesto por acil-CoA y acil-lípido desaturasas de membrana, cuyas características se describen en la sección 7.1.1. En cuanto a las características estructurales analizadas bioinformáticamente, resulta evidente que las desaturasas de *M. smegmatis* poseen características únicas y no descriptas hasta el momento. La localización sub-celular típica de las desaturasas que poseen cajas de histidina es la membrana (ya sea de cianobacterias, bacterias o cloroplastos de plantas superiores). De las cuatro desaturasas presentes en el genoma de *M. smegmatis*, solamente Des1743 posee los cuatro segmentos transmembrana característicos de este grupo de enzimas, mientras que Des6835 (así como DesA3 de *M. tuberculosis*) solo posee un segmento transmembrana y Des1211 y Des1886 son proteínas solubles. Esta característica es claramente diferencial en este grupo de enzimas y podría relacionarse con diferentes actividades catalíticas o localización de los productos. En cuanto a la composición de las cajas de histidina, la primera de las tres cajas no se encuentra en otras desaturasas descriptas, siendo entonces única y descripta por primera vez en este trabajo. La segunda caja se encuentra presente en desaturasas de cianobacterias [217] y la tercera es típica de desaturasas de cianobacterias y de plantas superiores [224]. Este análisis abre la posibilidad de encontrarnos frente a un nuevo grupo de desaturasas con características propias y particulares.

La sobreexpresión de las desaturasas no arrojó indicios a la pregunta sobre las actividades enzimáticas de las mismas, ni en la cepa salvaje ni en la cepa mutante. No se vieron modificados los niveles de crecimiento a ninguna de las temperaturas ensayadas, excepto por una leve recuperación en la cepa mutante por la sobreexpresión de Des1743. En suma, los perfiles lipídicos analizados por GC-MS no mostraron diferencias significativas. De todos modos, ante la falta del control de sobreexpresión por *western blot*, no es posible afirmar que la sobreexpresión realmente esté ocurriendo. Un punto a tener en cuenta es que el promotor acetamidasa tiene una tendencia natural a expresar el gen clonado bajo su control aún en ausencia del inductor [225-227]; entonces, si el nivel de inducción no es lo suficientemente grande tal vez no sea posible observar diferencias entre

muestras de cultivos inducidos y sin inducir en un gel de SDS teñido con *coomasie*. Por otra parte, es posible que aunque se esté produciendo la sobreexpresión, ésta no se refleje en los niveles de crecimiento ni en los perfiles lipídicos por dos motivos: o bien porque en condiciones de sobreexpresión de una enzima, la bacteria produzca un reajuste metabólicos que mantengan los niveles totales de ácidos grasos constantes y por lo tanto, el crecimiento no se vea afectado. Otra posibilidad es que simplemente estas proteínas no tengan la función biológica estimada por estudios de homología de secuencia. Por esta razón se intentó construir mutantes nulas para cada gen, incluyendo DesA3 de *M. tuberculosis* mediante *recombineering*. Sin embargo, esta metodología falló en su propósito hasta el momento y no fue posible la obtención de tales mutantes. Si bien esta técnica nos permitió deletar a *MSMEG_1886* con éxito, no permitió lo propio para los demás genes evaluados. Una causa posible es que la frecuencia de recombinación de fragmentos de ADN doble cadena parece estar limitada principalmente por la baja eficiencia de incorporación de ADN de las micobacterias, más que por los niveles de expresión de las proteínas del sistema utilizado o por la degradación del ADN exógeno por nucleasas. Aún con cepas altamente competentes que produzcan de $1-5 \times 10^6$ transformantes por μg de ADN plasmídico, solamente se puede obtener una célula viable de cada mil que incorpore el ADN productivamente [228]. Es así que ante repetidos intentos fallidos se decidió utilizar la estrategia de silenciamiento de los genes de las desaturasas de *M. smegmatis* mediante la construcción de ARNm antisentido para cada gen.

La inhibición específica de genes utilizando la expresión de *cassettes* antisentido ha sido utilizada en micobacterias [229-233]. El mecanismo de inhibición de la expresión génica mediante la utilización de genes antisentido funcionaría mayormente a través de la formación de complejos con los ARNm codificantes y el consecuente bloqueo de la traducción. Luego puede ocurrir una degradación de los complejos formados o bien una disminución en su estabilidad. Naturalmente, existe una regulación génica mediada por ARNm antisentido altamente evolucionada que controla la replicación plasmídica, por ejemplo el sistema de muerte *hok* [234]. El análisis de nuestros resultados muestra una reducción importante en los niveles de ARNm de cada gen analizado, por lo que el silenciamiento ocurre fehacientemente. Además el crecimiento tanto de la cepa salvaje como de la cepa mutante se ven afectados en presencia de los ARNm antisentido en condiciones de inducción con IVN, pero solamente a 25 y 37°C. A 42°C el crecimiento de la cepa salvaje es independiente de la presencia del inductor y por lo tanto del ARNm antisentido. Por otra parte a nivel de la síntesis de ácidos grasos se observan modificaciones en los perfiles de las cepas en presencia de los ARNm antisentido. En este punto, es importante recalcar que el comportamiento de las cepas mc²155 y UNRA1886 fue diferente en condiciones de silenciamiento de las desaturasas y

según la temperatura de crecimiento. En la cepa salvaje, el aumento en la proporción de C18:1 indica que en ausencia de Des1743 y Des1211 el entorno regulatorio cambia y por lo tanto las desaturasas restantes, o bien Des1886 trabaja en mayor cuantía para suplir la función de la desaturasa que no está funcionando en ese momento. En la cepa mutante, en cambio, los ácidos oleico y palmitoleico (en sus tres isómeros) disminuyen y se produce una acumulación de intermediarios metilados que puede estar originada por la ausencia de dos actividades desaturantes al mismo tiempo: Des1886/Des1211 o Des1886/Des1743. La bacteria introduce ramificaciones en las cadenas carbonadas para mantener la fluidez de membrana aún en ausencia de AGI. Es probable también que en estas condiciones, se encuentre sobreexpresada alguna metiltransferasa que sea la responsable de introducir las ramificaciones. En este punto, es interesante aclarar que no se estaría produciendo una reducción de los dobles enlaces, ya que en dicho caso deberían acumularse productos hidroxilados, mientras que se acumulan productos metilados. Por ello, se puede hipotetizar que se esté utilizando propionil-CoA además de acetil-CoA para la síntesis de estos ácidos grasos. También resulta importante resaltar que el ácido nervónico (C24:1) desaparece con la expresión del ARNm antisentido del gen *MSMEG_1743* en la cepa salvaje (tanto a 25 como a 37°C) y disminuye por la expresión de los ARNm antisentido de *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743* en la cepa mutante a 25°C. Este dato podría llevar a la conclusión de que una de las dos desaturasas codificadas por estos genes, o las dos, es capaz de desaturar C24:0. En *M. smegmatis* se ha descrito dicho sistema en la fracción citoplasmática, el cual está compuesto por tres componentes: una desaturasa, una oxido-reductasa dependiente de NADPH y una ferredoxina. Esta fracción obtenida es capaz de desaturar acil-CoAs de 24 carbonos mayoritariamente pero también desatura cadenas de 18, 20 y 22 átomos de carbono con menor afinidad. Por otra parte, la fracción de membrana desatura mayoritariamente estearoil-CoA. No se describe la utilización de palmitoil-CoA en ninguna de las fracciones, quedando este ácido graso fuera del estudio [139]. Un segundo sistema desaturante descrito en micobacterias es el de *M. phlei* que introduce un doble enlace en posición $\Delta 9$ de los ácidos palmítico y esteárico. El sistema está formado por la/s desaturasa/s, un citocromo *c* reductasa dependiente de NADPH y un donador de electrones desconocido [136, 138].

Un detalle a tener en cuenta es que en la mayoría de los casos en que se utiliza como herramienta un ARNm antisentido se puede observar que el silenciamiento no es total y queda un remanente de ARNm que puede ser traducido a proteínas [229-232, 235]. Este remanente de proteína puede generar AGI y entorpecer el análisis de nuestros resultados. En conjunto, los resultados obtenidos del silenciamiento de *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743* aportan evidencia sólida para asignar una función desaturasa a los productos de estos genes. No es posible adjudicar actividades específicas para cada una de ellas, pues no se cuenta con un entorno genético en el que

solo se evalúe la actividad de cada una de ellas a la vez. Tampoco es posible asignar una función a *MSMEG_6835*, ya que los cambios observados no son tan evidentes y se carece de la expresión de los ARNm antisentido en la cepa mutante. Es necesario entonces la construcción de mutantes delecionales o su sobreexpresión en una cepa de *M. tuberculosis* mutante para DesA3.

En relación a la síntesis de ácido oleico, la delección de DesA3 en *M. tuberculosis* (M. Jackson, CSU, comunicación personal), no produce auxotrofia para este ácido graso. Por el contrario, el fenotipo de la cepa mutante concuerda con el fenotipo de la cepa UNRA1886. Es decir, que la cepa Δ DesA3 muestra un *lag* de crecimiento muy pronunciado a 37°C, luego del cual comienza a crecer con una velocidad menor a la de la cepa salvaje H37Rv. Esta cepa se ve afectada en la síntesis de ácidos grasos de la misma manera que UNRA1886, produciendo menor cantidad de ácidos oleico y hexadecenoico en sus tres isómeros. Por todo esto, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y a la comparación de datos con la mutante en DesA3, y teniendo en cuenta que *M. tuberculosis* solamente posee una desaturasa en su genoma, es posible inferir que existe una vía alternativa de síntesis de ácido oleico en micobacterias que no es mediada por desaturasas. Sin embargo, no se encuentran homólogos de proteínas como FabA de *E. coli* [236], mientras que existen numerosos homólogos de FabM de *S. pneumoniae* [237], tanto en el genoma de *M. tuberculosis* como en el de *M. smegmatis*. En particular, el gen *MSMEG_1739*, localizado en la cercanía de Des1743 codifica para una hidratasa/isomerasa homóloga de FabM (29% identidad). Esta proteína podría ser un candidato para la síntesis alternativa propuesta, pero se carece de evidencias que lo afirmen.

Las características estructurales diferenciales que muestran las desaturasas de *M. smegmatis* en particular y de micobacterias en general, plantea la existencia de desaturasas no descritas hasta el momento. Se puede pensar en una divergencia evolutiva que haya hecho que se diferencien del resto de las desaturasas convencionales. El entendimiento de la relación estructura-función de estas enzimas, así como el conocimiento de todos los elementos constitutivos de estos sistemas es sumamente interesante y permitirá comprender no solamente el sistema en sí, sino también quizás las diferencias de crecimiento entre *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.

8. CONCLUSIONES

- ✓ Los cambios de temperatura producen modificaciones en la velocidad de crecimiento de *M. smegmatis* mc²155. Cuando disminuye la temperatura también lo hace la velocidad de crecimiento.
- ✓ Los cambios de temperatura afectan la composición lipídica de *M. smegmatis* mc²155. A menor temperatura aumenta la cantidad de AGI y se acortan las cadenas carbonadas.
- ✓ La composición de ácidos micólicos se modifica en función de la temperatura de crecimiento. A menor temperatura disminuye la proporción de la subfamilia α ' y aumentan las proporciones de las subfamilias α y ϵ . Además, predominan cadenas carbonadas más extensas y con insaturaciones.
- ✓ El genoma de *M. smegmatis* mc²155 codifica para cuatro homólogos de la desaturasa DesA3 de *M. tuberculosis*. Los cuatro comparten elevada homología de secuencia, la distribución de cajas de histidina y además poseen la misma organización genómica, codificándose corriente arriba de cada desaturasa (excepto para Des1211) una óxido-reductasa, que se transcribe junto con cada desaturasa.
- ✓ Los promotores de las desaturasas y las óxido-reductasas descritas poseen regiones palindrómicas que podrían ser zonas de unión para reguladores transcripcionales.
- ✓ Las desaturasas de *M. smegmatis* mc²155 no se encuentran reguladas por temperatura a nivel transcripcional, pero OR1885 muestra una regulación por temperatura, por lo que no se descarta una regulación del operón *MSMEG_1885/1886*.
- ✓ Des1211 se encuentra regulada por ácido oleico a nivel transcripcional, reduciéndose los niveles de actividad reportera en presencia de este ácido graso.
- ✓ En el genoma de *M. smegmatis* mc²155 se codifica un regulador de la familia TetR, corriente arriba del operón OR1742-Des1743, que comparte homología con el regulador del operón DesBC de *P. aeruginosa* PAO1 (DesT). Esta proteína podría regular la transcripción del operón mencionado y tal vez del resto de las desaturasas de esta bacteria. El genoma de *M. tuberculosis* no posee ningún homólogo de DesT.
- ✓ La cepa UNRA1886 presenta un defecto de crecimiento, tanto en medio líquido como en medio sólido. En medio líquido muestra una fase *lag* más extensa que la cepa salvaje. En medio sólido presenta alteraciones morfológicas y reducción del tamaño de las colonias, respecto de la cepa salvaje. Además, recupera parcialmente el defecto de crecimiento en medio líquido y sólido por el agregado de AGI al medio de cultivo. La complementación

con una copia en *trans* del gen *MSMEG_1886*, revierte el fenotipo de la cepa mutante a niveles de la cepa salvaje.

- ✓ La cepa UNRA1886 no muestra alteraciones en los perfiles de ácidos micólicos y glicolípidos, al menos por la metodología empleada, mientras que presenta alteraciones en los perfiles de ácidos grasos de cadena corta-media. Disminuyen las proporciones de C16:1 y C18:1 y se acumulan C16:0 y C18:0. Esto permite asignarle a Des1886 la función de desaturasa con especificidad para cadenas de 16 y 18 carbonos de longitud.
- ✓ La cepa mutante nula en *MSMEG_1886* presenta sensibilidad aumentada a diferentes drogas de diferente naturaleza química, incluyendo ISO y TAC. La reducción de la CIM para estas últimas drogas revierte a valores de la cepa salvaje por el agregado de ácido oleico. Por ello, se deduce que Des1886 es responsable de parte de la resistencia natural de *M. smegmatis* a estas drogas.
- ✓ La complementación de la cepa UNRA1886 con el resto de las desaturasas no produjo modificaciones ni del crecimiento ni del perfil de lípidos de esta cepa. Sin embargo, no se pudo confirmar la sobreexpresión fehaciente de tales desaturasas.
- ✓ La expresión de los ARNm antisentido produjo disminución del crecimiento de las cepas salvaje y mutante a 25 y 37°C, mientras que no produjo modificaciones en la cepa salvaje a 42°C.
- ✓ La expresión de los ARNm antisentido produjo alteraciones en los perfiles lipídicos de las cepas salvaje y mutante. En la primera, se produjo una disminución de C18:1 a 37°C por la expresión de los ARNm antisentido de *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743* y un descenso en la proporción de C24:1 a 25 y 37°C por la expresión del ARNm antisentido de *MSMEG_1743*. En la cepa mutante debido a la expresión de los ARNm antisentido de *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743*, se acumularon especies más cortas, y ramificadas (C15:0 y C15:0 aCH₃), tanto a 25 como a 37°C. Además, a 25°C se redujo la proporción de C24:1.
- ✓ Estos resultados sugieren que Des1211 y Des1743 serían desaturasas de ácidos grasos, probablemente con especificidad para C18:0 y tal vez para C24:0.
- ✓ Existe una vía alternativa de síntesis de ácido oleico en *M. smegmatis* mc²155, ya que aún en ausencia de dos desaturasas existe un remanente de este ácido graso. Además una cepa mutante en DesA3 de *M. tuberculosis* sigue sintetizando ácido oleico, en ausencia de otros homólogos de esta desaturasa.

9. RESÚMEN

El género *Mycobacterium* está compuesto por organismos aerobios, no esporulados, con elevado contenido de G+C en sus genomas y con una estructura de pared celular muy particular y rica en lípidos, constituyendo estos componentes más del 60% del peso seco de la bacteria. La envoltura celular de las micobacterias es una estructura compleja compuesta por la membrana plasmática y la membrana externa. La membrana plasmática no difiere de la membrana de otras bacterias, mientras que la membrana externa es una macromolécula químicamente compuesta por tres constituyentes unidos covalentemente: péptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos.

Los lípidos son constituyentes fundamentales de todas las células por ser componentes estructurales de las membranas. La biosíntesis de ácidos grasos es el primer paso en la formación de los lípidos de membrana y es esencial para las bacterias. Estos componentes son sintetizados mediante sintetasas de ácidos grasos (FAS) que pueden ser de dos tipos FASI y FASII. La composición lipídica de las membranas biológicas varía según las condiciones ambientales, por ejemplo ante cambios de temperatura. Una disminución en la misma produce un aumento en la rigidez de las membranas que requiere la presencia de AGI para recuperar la fluidez necesaria de aquellas. Sin embargo FAS solamente pueden sintetizar AGS. La síntesis de AGI en bacterias se lleva a cabo mediante dos mecanismos: uno anaeróbico y uno dependiente de oxígeno, catalizado por enzimas denominadas desaturasas. Las desaturasas reclutan y activan el oxígeno molecular para modificar enlaces carbono-hidrógeno en una cadena acilada, dando como producto un AGI.

Por ello, en este trabajo, se decidió analizar el efecto de los cambios de temperatura sobre la fisiología de *M. smegmatis*. Para ello se llevaron a cabo diferentes tipos de análisis. Se realizaron curvas de crecimiento a diferentes temperaturas y se analizó además la composición lipídica (a través de TLC y GC-MS) en estas condiciones, tanto de ácidos grasos de cadena corta-media, como de ácidos micólicos. Además, se realizó un análisis transcripcional de las regiones promotoras de las desaturasas y sus óxido-reductasas a diferentes temperaturas y en presencia de ácidos grasos insaturados. Se determinó que una disminución en la temperatura produce una reducción en la velocidad de crecimiento, un aumento en la síntesis de AGI y un aumento en la proporción de ácidos α y ϵ micólicos, en tanto que una reducción en la cantidad de ácidos α' micólicos. La actividad transcripcional de las desaturasas no se vio afectada por el descenso en la temperatura, pero se redujo en presencia de AGI.

El genoma de *M. smegmatis* codifica para cuatro enzimas con homología a la esteroil-desaturasa DesA3 de *M. tuberculosis*. Para determinar la función de estas enzimas se utilizaron diferentes estrategias. Por un lado se deletionó el gen *MSMEG_1886* mediante *recombineering* y se caracterizó fenotípicamente a la mutante UNRA1886. Se determinó que esta cepa presenta un defecto severo tanto en el crecimiento en medio líquido y sólido, como en la síntesis de AGI, principalmente C16:1 y C18:1. Para determinar la función del resto de las desaturasas se realizaron ensayos de complementación de la cepa UNRA1886 con cada desaturasa, bajo un promotor inducible por acetamida. Sin embargo, mediante esta metodología no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por ello se silenciaron las desaturasas mediante ARNm antisentido, tanto en la cepa salvaje mc²155 como en la cepa UNRA1886. Se analizó el crecimiento en medio líquido y la composición lipídica mediante GC-MS. Las cepas que expresan los ARNm antisentido presentaron una disminución en la velocidad de crecimiento y una alteración en los perfiles de lípidos. Se determinó que los genes *MSMEG_1211* y *MSMEG_1743* podrían ser desaturasas de ácidos grasos, mientras que no se encontró evidencia suficiente para asignar una función a *MSMEG_6835*. Es necesario entonces, deletionar estos tres genes para definir la función exacta de cada uno de ellos.

Además se evaluó el efecto de la droga antituberculosa isoxil sobre el crecimiento de las cepas mc²155 y UNRA1886, determinándose que la CIM para esta droga disminuye cuatro veces en la cepa mutante respecto de la cepa salvaje. El efecto sobre el crecimiento en la cepa mutante revierte por el agregado de AGI al medio. Por ello, se postula a *MSMEG_1886* como uno de los blancos posibles de isoxil en *M. smegmatis*.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Mansilla, M., Cybulski, LE, Albanesi, D and de Mendoza, D, *Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors*. J Bacteriol., 2004. **186**: p. 6681–6688.
2. Nelson, D.L.a.C., MM, *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4ª ed, ed. E. Omega. 2006, Barcelona.
3. Madigan MT, M.J., Stahl DA, Clark DP, *Brook Biology of microorganisms*. 13th ed. 2012, San Francisco, CA, USA: Pearson Education, Inc.,.
4. Shanklin J, C.E., *Desaturation and related modifications of fatty acids*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., 1998. **49**: p. 611-641.
5. Koneman, E., Allen, SD, Janda,WM, Schreckenberger, PC and Winn, WC. , ed. *Mycobacteries. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. ed. t. ed. 1997, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, PA.
6. Pfyffer, G., Brown-Elliott, BA and Wallace, RJ Jr, *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures*, in *Manual of Clinical Microbiology*, E.J.B. Murray, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover Editor. 2003, ASM Press: Washington, D.C. p. p. 532-559.
7. Silva, M.a.M., PM., *The interpretation of the ultrastructure of mycobacterial cells in transmission electron microscopy of ultrathin sections*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1983. **51**(2): p. 225-34.
8. Daffé, M.D., MA and Gas, N., *The cell envelope of Mycobacterium smegmatis: cytochemistry and architectural implications*. FEMS Microbiol. Lett, 1989. **61**: p. 89-94.
9. Brodie, A., Kalra, VK, Lee, SH and Cohen, NS., *Properties of energy-transducing systems in different types of membrane preparations from Mycobacterium phlei preparation, resolution, and reconstitution*. Methods Enzymol, 1979. **55**: p. 175-200.
10. Ortalo-Magné, A., Andersen, A and Daffé, M, *The outermost capsular arabinomannans and other mnn-conjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli*. Microbiology, 1996. **142**: p. 927-935.
11. Besra, G., Khoo, KH, McNeil, MR, Dell, A, Morris, HR and Brennan, PJ., *A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of Mycobacterium tuberculosis as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-*

- atom bombardment mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Biochemistry, 1995. **34**(13): p. 4257-66.
12. Brennan, P.a.N., H., *The envelope of mycobacteria*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 29-63.
13. Hill DL, B.C., *Biosynthesis of mannophospholipids by Mycobacterium phlei*. J Biol Chem, 1966. **241**: p. 895–902.
14. Brennan P, B.C., *Biosynthesis of mannophosphoinositides by Mycobacterium phlei. The family of dimannophosphoinositides*. J Biol Chem, 1967. **242**: p. 3046–3056.
15. Schlesinger LS, H.S.a.K.T., *Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages*. J Immunol, 1994. **152**: p. 4070–4079.
16. Chatterjee, D.a.K., KH, *Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects*. Glycobiology, 1998. **8**: p. 113–120.
17. McNeil, M., Daffe, M and Brennan, PJ., *Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria*. J Biol Chem, 1991. **266**(20): p. 13217-23.
18. Daffé, M., *Structure de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis*. Med. Mal. Infect., 1996. **26**: p. 1-7.
19. Daffe, M.a.D., P., *The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity*. Adv Microb Physiol, 1998. **39**: p. 131-203.
20. Hong, X., Hopfinger, AJ., *Molecular modeling and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell wall permeability*. Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 1066-77.
21. Nikaido, H., Kim, SH and Rosenberg, EY., *Physical organization of lipids in the cell wall of Mycobacterium chelonae*. Mol Microbiol, 1993. **8**: p. 1025-1030.
22. Hoffmann, C., Leis, A, Niederweis, M, Plitzko, JM and Engelhardt, H., *Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3963-7.
23. De Rosa M, G.A., Gliozzi A., *Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids*. Microbiol Rev., 1986. **50**: p. 70–80.
24. Cronan, J., Rock, CO, *Biosynthesis of membrane lipids, in Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.*, R. Curtiss, 3rd; Kaper, J.; and P.N. Karp, F.; Nyström, T.; Slauch, J.; Squires, C.; Ussery, D., Editors. 2008, ASM Press: Washington, DC:.
25. Rock, C., *Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes*, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.*, D.V. Vance, JeanE., Editor. 2008, Elsevier. p. 59-96.

26. Rawlings, B., *Biosynthesis of fatty acids and related metabolites*. Nat Prod Rep, 1998. **15**: p. 275–308.
27. Rock, C.a.C., JE., *Escherichia coli as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1302**(1): p. 1-16.
28. Schweizer, E.a.H., J., *Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(3): p. 501-17, table of contents.
29. Bloch K, V.D., *Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 263–298.
30. Wood WI, P.D., Bloch K., *Subunit structure of Mycobacterium smegmatis fatty acid synthetase. Evidence for identical multifunctional polypeptide chains*. J Biol Chem, 1978. **253**: p. 2650–2656.
31. Bloch, K. and D. Vance, *Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 263-98.
32. Lynen, F., *On the structure of fatty acid synthetase of yeast*. Eur J Biochem, 1980. **112**: p. 431–442.
33. Vilcheze, C., Morbidoni, HR, Weisbrod, TR, Iwamoto, H, Kuo, M, Sacchettini, JC and Jacobs, WR Jr., *Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 2000. **182**(14): p. 4059-67.
34. Zimhony, O., Vilcheze, C and Jacobs, WR Jr., *Characterization of Mycobacterium smegmatis expressing the Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I (fasI) gene*. J Bacteriol, 2004. **186**: p. 4051-4055.
35. Choi, K., Kremer, L, Besra, GS and Rock, CO., *Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28201-7.
36. Marrakchi, H., Laneelle, G and Quemard, A., *InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 2),: p. 289-296.
37. Marrakchi, H., Ducasse, S, Labesse, G, Montrozier, H, Margeat, E, Emorine, L, Charpentier, X, Daffe, M and Quemard, A., *MabA (FabG1), a Mycobacterium tuberculosis protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 4): p. 951-60.

38. Sacco, E., Covarrubias, AS, O'Hare, HM, Carroll, P, Eynard, N, Jones, TA, Parish, T, Daffe, M, Backbro, K and other authors, *The missing piece of the type II fatty acid synthase system from Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **104**: p. 14628-14633.
39. Bhatt, A., Molle, V, Besra, GS, Jacobs, WR, Jr and Kremer, L. , *The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development*. Mol Microbiol., 2007. **64**: p. 1442-1454.
40. Kremer, L., Dover, LG., Carrere, S, Nampoothiri, KM, Lesjean, S, Brown, AK, Brennan, PJ, Minnikin, DE, Locht, C and other authors, *Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase Acondensing enzyme from Mycobacterium tuberculosis*. Biochem J, 2002. **364**: p. 423-430.
41. Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C, Houssin, C, Grimaldi, C, Chami, M, Daffe, M and Guilhot, C., *A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 314-9.
42. Lea-Smith, D., Pyke, JS, Tull, D, McConville, MJ, Coppel, RL and Crellin, PK., *The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan*. J Biol Chem, 2007. **282**: p. 11000-11008.
43. Lösel, D., *Lipids in the structure and function of fungal membranes.*, in *Biochemistry of the cell walls and membranes in fungi* T.A. Kuhn PJ, Jung MJ, Goosey MW, Copping LG, Editor. 1990, Springer-Verlag: New York. p. 119-133.
44. Hazel JR, W.E., *The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment*. Prog Lipid Res., 1990. **29**: p. 167-227.
45. Lindblom G, O.G., Rilfors L, Morein S, *Regulation of lipid composition in Acholeplasma laidlawii and Escherichia coli membranes: NMR studies of lipid lateral diffusion at different growth temperatures*. Biochemistry. , 2002. **41**: p. 11512-11515.
46. Gostincar, C., Turk, M, Plemenitas, A and Gunde-Cimerman, N., *The expressions of Delta 9-, Delta 12-desaturases and an elongase by the extremely halotolerant black yeast Hortaea werneckii are salt dependent*. FEMS Yeast Res, 2009. **9**(2): p. 247-56.
47. Annous, B., Becker, LA, Bayles, DO, Labeda, DP and Wilkinson, BJ., *Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of Listeria monocytogenes at low temperatures*. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**: p. 3887-3894.

48. Mastronicolis, S., Arvanitis, N, Karaliota, A, Litos, C, Stavroulakis, G, Moustaka, H, Tsakirakis, A and Heropoulos, G., *Cold dependence of fatty acid profile of different lipid structures of Listeria monocytogenes*. Food. Microbiol. , 2005. **22**: p. 213-219.
49. Mazzotta, A.a.M., TJ., *Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of Listeria monocytogenes nisin-resistant strains at 10°C and 30°C*. J. Appl. Microbiol., 1997. **82**: p. 32-38.
50. Pu'ttmann, M., N. Ade, and H. Hof., *Dependence of fatty acid composition of Listeria spp. on growth temperature*. Res. Microbiol., 1993. **144**: p. 279–283.
51. Kaneda, T., *Fatty acids of the genus Bacillus: an example of branched-chain preference*. Bacterial Rev, 1977. **41**(391–418).
52. Choi, K., Heath, RJ and Rock, CO., *beta-Ketoacylacyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis*. J Bacteriol, 2000. **182**: p. 365-370.
53. Klein, W., Weber, MH and Marahiel, MA. , *Cold shock response of Bacillus subtilis: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures*. J Bacteriol, 1999. **181** p. 5341–5349.
54. Los DA, M.N., *Structure and expression of fatty acid desaturases*. Biochim Biophys Acta., 1998. **1394**: p. 3-15.
55. Aguilar PS, d.M.D., *Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans*. Mol Microbiol., 2006. **62**: p. 1507-1514.
56. Mansilla MC, C.L., Albanesi D, de Mendoza D, *Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors*. J Bacteriol., 2004. **186**: p. 6681-6688.
57. Garwin, J., Klages, AL, and Cronan, JE Jr., *Structural, enzymatic, and genetic studies of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases I and II of Escherichia coli*. J Biol Chem., 1980. **255**: p. 11949-56.
58. Garwin JL, K.A., Cronan JE Jr., *Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of Escherichia coli. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis*. J Biol Chem. , 1980. **255**: p. 3263-5.
59. Cronan, J.a.R., C., in *EcoSal, Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, A. Böck, Curtiss, R., 3rd, Kaper, J., Karp, P., Neidhardt, F., Nystro'm, T., Slauch, J., Squires, C., and Ussery, D., Editor. 2008, ASM Press: Washington, DC.
60. Feng, Y.a.C., JE. , *Escherichia coli Unsaturated Fatty Acid Synthesis. Complex Transcription of the fabA gene and in vivo identification of the essential reaction catalyzed by FabB*. J Biol Chem., 2009. **284**: p. 29526-29535.

61. Heath, R.a.R., CO., *The Claisen condensation in biology*. Nat. Prod. Rep., 2002. **19**: p. 581–596.
62. Totcher, D., Leaver, MJ, and Hodgson, PA., *Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases*. Progr. Lipid Res., 1988. **37**: p. 73–117.
63. Cronan, J., *A bacterium that has three pathways to regulate membrane lipid fluidity*. Mol Microbiol., 2006. **60**: p. 256-259.
64. Marrakchi, H., Choi, K.H., and Rock, C.O., *A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 44809–44816.
65. Wang, H., and Cronan, J.E., *Functional replacement of the FabA and FabB proteins of Escherichia coli fatty acid synthesis by Enterococcus faecalis FabZ and FabF homologues*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 34489–34495.
66. Tocher DR, L.M., Hodgson PA., *Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases*. Prog Lipid Res., 1998. **37**: p. 73-117.
67. Pereira SL, L.A., Mukerji P., *Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. , 2003. **68**: p. 97-106.
68. Sperling P, T.P., Zank TK, Heinz E., *The evolution of desaturases*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids., 2003. **68**: p. 73-95.
69. Mansilla MC, d.M.D., *The Bacillus subtilis desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing*. Arch Microbiol., 2005. **183**: p. 229-35.
70. Zhu K, C.K., Schweizer HP, Rock CO, Zhang YM., *Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol., 2006. **60**: p. 260-273.
71. Shanklin J, S.C., *Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1991. **88**: p. 2510-2514.
72. Shanklin J, C.E., *Desaturation and related modifications of fatty acids*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., 1998. **49**: p. 611-641.
73. Moche M, S.J., Ghoshal A, Lindqvist Y., *Azide and acetate complexes plus two iron-depleted crystal structures of the di-iron enzyme delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase. Implications for oxygen activation and catalytic intermediates*. J Biol Chem. , 2003. **278**: p. 25072-80.

74. Lindqvist Y, H.W., Schneider G, Shanklin J., *Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins.* EMBO J, 1996. **15**: p. 4081-92.
75. Whittle E, C.E., Subrahmanyam S, Shanklin J., *A multifunctional acyl-acyl carrier protein desaturase from Hedera helix L. (English ivy) can synthesize 16- and 18-carbon monoene and diene products.* J Biol Chem., 2005. **280**: p. 28169-28176.
76. Guy JE, W.E., Kumaran D, Lindqvist Y, Shanklin J., *The crystal structure of the ivy Delta4-16:0-ACP desaturase reveals structural details of the oxidized active site and potential determinants of regioselectivity.* J Biol Chem., 2007. **282**: p. 19863-19871.
77. Stuke JE, M.V., Martin CE, *The OLE1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes the 19 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene.* J. Biol. Chem., 1990. **265**: p. 20144-10149.
78. Shanklin J, W.E., Fox BG., *Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase.* Biochemistry, 1994. **33**: p. 12787–12794.
79. Avelange-Macherel MH, M.D., Wada H, Murata N., *Site-directed mutagenesis of histidine residues in the 112 acyl-lipid desaturase of Synechocystis.* FEBS Lett. , 1995. **361**: p. 111–114.
80. Schmidt H, D.T., Buck F, Heinz E, *Purification and PCR-based cDNA cloning of a plastidial n-6 desaturase.* Plant Mol. Biol., 1994. **26**: p. 631–642.
81. Suzuki M, H.T., Shaw JP, Rekik M, Harayama S, *Primary structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system.* J. Bacteriol., 1991. **173**: p. 1690-1695.
82. Reed DW, T.D., Covello PS., *Metabolism of hydroxy fatty acids in developing seeds in the genera Lesquerella (Brassicaceae) and Linum (Linaceae).* Plant Physiol., 1997. **114**: p. 63-68.
83. Cahoon EB, C.S., Shanklin J., *Characterization of a structurally and functionally diverged acyl-acyl carrier protein desaturase from milkweed seed.* Plant Mol. Biol., 1977. **33**: p. 1105–1110.
84. Cahoon EB, O.J., *Metabolic evidence for the involvement of a 14-palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in the synthesis of petroselinic acid in coriander endosperm and transgenic tobacco cells.* Plant Physiol., 1994. **104**: p. 827-838.
85. Gibson, K., *Palmitoleate formation by soybean stearoyl-acyl carrier protein desaturase.* Biochim. Biophys. Acta, 1993. **1169**: p. 231-235.

86. McKeon TA, S.P., *Purification and characterization of the stearylacyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower*. J. Biol. Chem., 1982. **257**: p. 12141–12147
87. Schultz DJ, C.E., Shanklin J, Craig R, Cox-Foster DL, et al., *Expression of a19-14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of omega 5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (Pelargonium xhortorum)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. **93**: p. 8771–8775.
88. Meesapyodsuk D, R.D., Savile CK, Buist PH, Ambrose SJ, Covello PS., *Characterization of the regiochemistry and cryptoregiochemistry of a Caenorhabditis elegans fatty acid desaturase (FAT-1) expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry., 2000. **39**: p. 11948-11954.
89. Hoffmann M, H.E., Busch S, Kassner N, Ternes P, Braus GH, Feussner I., *A small membrane-peripheral region close to the active center determines regioselectivity of membrane-bound fatty acid desaturases from Aspergillus nidulans*. J Biol Chem., 2007. **282**: p. 26666-26674.
90. Meesapyodsuk D, R.D., Covello PS, Qiu X., *Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of Claviceps purpurea*. J Biol Chem., 2007. **282**: p. 20191-20199.
91. Damude HG, Z.H., Farrall L, Ripp KG, Tomb JF, Hollerbach D, Yadav NS., *Identification of bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 2006. **103**: p. 9446-9451.
92. Zhang S, S.E., Ito K, Shimizu S., *Identification of a novel bifunctional delta12/delta15 fatty acid desaturase from a basidiomycete, Coprinus cinereus TD#822-2*. FEBS Lett. 2007, 2007. **581**: p. 315-319.
93. Dyer JM, C.D., Kuan JC, Mullen RT, Turner C, McKeon TA, Pepperman AB., *Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity*. Plant Physiol., 2002. **130**: p. 2027-2038.
94. Nagai J, B.K., *Synthesis of oleic acid by Euglena gracilis*. J Biol Chem, 1965. **240**: p. 3702-3723.
95. Bloch , K., *Enzymatic synthesis of monounsaturated fatty acids*. Acc. Chem. Res., 1969. **2**: p. 193–202.
96. Schroepfer GJ Jr, B.K., *The stereospecific conversion of stearic to oleic acid*. J Biol Chem., 1965. **240**: p. 54-63.

97. Mudd JB, S.P., *Fat metabolism in higher plants. XIV. Factors affecting the synthesis of oleic acid by particulate preparations from avocado mesocarp.* J Biol Chem., 1961. **236**: p. 2602-2609.
98. Bloomfield DK, B.K., *The formation of delta 9-unsaturated fatty acids.* J Biol Chem., 1960. **235**: p. 337-345.
99. Fulco, A., *Metabolic alterations of fatty acids.* Annu Rev Biochem. , 1974. **43**: p. 215-241.
100. Jaworski JG, S.P., *Fat metabolism in higher plants. Properties of a soluble stearyl-acyl carrier protein desaturase from maturing Carthamus tinctorius.* Arch Biochem Biophys, 1974. **162**: p. 158-165.
101. Nagai, J.a.B., K., *Enzymatic desaturation of stearyl acyl carrier protein.* J Biol Chem., 1968. **243**: p. 4626-4633.
102. Oshino N, I., Sato R., *Electrontransfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed.* Biochim. Biophys. , 1966. **128**: p. 13–28.
103. Strittmatter P, S.L., Corcoran D, Rogers MJ, Setlow B, Redline R., *Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase.* Proc Natl Acad Sci U S A. , 1974. **71**: p. 4565-4569.
104. Fox BG, S.J., Somerville C, Münck E., *Stearoyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase from Ricinus communis is a diiron-oxo protein.* Proc. Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: p. 2486-2490.
105. Nagai J , B.K., *Enzymatic desaturation of stearoyl-acyl carrier protein.* J. Biol. Chem., 1966. **241**: p. 1925–1927.
106. Schmidt H, H.E., *Involvement of ferredoxin in desaturation of lipidbound oleate in chloroplasts.* Plant Physiol., 1990. **94**: p. 214-220.
107. Wada H, S.H., Heinz E, Murata N., *In vitro ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes.* J. Bacteriol., 1993. **175**: p. 544-647.
108. Dailey HA, S.P., *Modification and identification of cytochrome b5 carboxyl groups involved in protein-protein interaction with cytochrome b5 reductase.* J. Biol. Chem., 1979. **254**: p. 5388–5396.
109. Hackett CS, S.P., *Covalent cross-linking of the active sites of vesicle-bound cytochrome b5 and NADHcytochrome b5 reductase.* J. Biol. Chem., 1984. **259**: p. 3275–3282.
110. Spatz L, S.P., *A form of cytochrome b5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971. **68**: p. 1042-1046.
111. Aguilar, P., Cronan, JE, Jr and de Mendoza, D., *A Bacillus subtilis gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase.* J Bacteriol, 1998. **180**: p. 2194–2200.

112. Kaan, T., Homuth, G, Mader, U, Bandow, J, and Schweder, T., *Genome-wide transcriptional profiling of the Bacillus subtilis cold-shock response*. Microbiology, 2002. **148**: p. 3441–3455.
113. Aguilar, P., Hernandez-Arriaga, AM., Cybulski, LE, Erazo, AC and de Mendoza, D., *Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in Bacillus subtilis*. EMBO J, 2001. **20**: p. 1681–1691.
114. Albanesi, D., Mansilla, MC and de Mendoza, D., *The membrane fluidity sensor DesK of Bacillus subtilis controls the signal decay of its cognate response regulator*. J Bacteriol, 2004. **186**: p. 2655–2663.
115. Cybulski, L., del Solar, G, Craig, PO, Espinosa, M and de Mendoza, D., *Bacillus subtilis DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 39340–39347.
116. Najle SR, I.M., de Mendoza D, Cybulski LE, *Oligomerization of Bacillus subtilis DesR is required for fine tuning regulation of membrane fluidity*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**: p. 1238–1243.
117. Stuke, J., McDonough, VM and Martin, CE., *Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1989. **264**: p. 16537–16544.
118. Martin, C., Oh, CS, Kandasamy, P, Chellapa, R, and Vemula, M., *Yeast desaturases*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**: p. 1080–1082.
119. Kwast, K., Burke, PV and Poyton, RO., *Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen responsive genes in yeast*. J Exp Biol, 1998. **201**: p. 1177–1195.
120. Nakagawa, Y., Sakumoto, N, Kaneko, Y and Harashima, S., *Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **291**: p. 707–713.
121. Vasconcelles, M., Jiang, Y, McDaid, K, Gilooly, L, Wretzel, S, Porter, DL, *Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of Saccharomyces cerevisiae genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 14374–14384.
122. Hoppe, T., Matuschewski, K, Rape, M, Schlenker, S, Ulrich, HD and Jentsch, S., *Activation of a membranebound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing*. Cell, 2000. **102**: p. 577–586.

123. Hitchcock, A., Krebber, H, Frietze, S, Lin, A, Latterich, M and Silver, PA., *The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membranebound transcription factor activation*. Mol Biol Cell, 2001. **12**: p. 3226–3241.
124. Rape, M., Hoppe, T, Gorr, I, Kalocay, M, Richly, H and Jentsch, S. , *Mobilization of processed, membranetethered SPT23 transcription factor by CDC48 (UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone*. Cell, 2001. **107**: p. 667–677.
125. Zhang, S., Skalsky, Y and Garfinkel, DJ., *MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in Saccharomyces cerevisiae*. Genetic, 1999. **151**: p. 473–483.
126. Jiang, Y., Vasconcelles, MJ, Wretzel, S, Light, A, Martin, CE and Goldberg, MA., *MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2001. **21**: p. 6161–6169.
127. Jiang, Y., Vasconcelles, MJ, Wretzel, S, Light, A, Gilooly, L, McDaid, K., *Mga2p processing by hypoxia and unsaturated fatty acids in Saccharomyces cerevisiae: impact on LORE-dependent gene expression*. Eukaryot Cell, 2002. **1**: p. 481–490.
128. McDonough, V., Stukey, JE and Martin, CE., *Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the Saccharomyces cerevisiae OLE1 gene*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 5931–5936.
129. Fujiwara, D., Yoshimoto, H, Sone, H, Harashima, S, and Tamai, Y., *Transcriptional co-regulation of Saccharomyces cerevisiae alcohol acetyltransferase gene, ATF1 and delta-9 fatty acid desaturase gene, OLE1 by unsaturated fatty acids*. Yeast, 1998. **14**: p. 711–721.
130. Gonzalez, C.a.M., CE., *Fatty acid-responsive control of mRNA stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the Saccharomyces OLE1 transcript*. J Biol Chem, 1996. **271**: p. 25801–25809.
131. Vemula, M., Kandasamy, P., Oh, C.S., Chellappa, R., Gonzalez, C.I., and Martin, C.E., *Maintenance and regulation of mRNA stability of the Saccharomyces cerevisiae OLE1 gene requires multiple elements within the transcript that act through translation-independent mechanisms*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 45269–45279.
132. Kandasamy, P., Vemula, M, Oh, CS, Chellappa, R, and Martin, CE., *Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis in Saccharomyces: the endoplasmic reticulum membrane protein, Mga2p, a transcription activator of the OLE1 gene, regulates the stability of the OLE1 mRNA through exosome-mediated mechanisms*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 36586–36592.

133. Kun Zhu, K.-H.C., Herbert P. Schweizer, Charles O. Rock and Yong-Mei Zhang, *Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Microbiology, 2006. **60**: p. 260-273.
134. Zhang, Y., Zhu, K, Frank, MW and Rock, CO., *A Pseudomonas aeruginosa transcription factor that senses fatty acid structure*. Mol. Microbiol., 2007. **66**: p. 622–632.
135. Chitra Subramanian, C.O.R., * and Yong-Mei Zhang, *DesT Coordinates the Expression of Anaerobic and Aerobic Pathways for Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2010. **192**: p. 280-285.
136. Kashiwabara, Y.a.S., R., *Electron Transfer Mechanism Involved in Stearoyl-Coenzyme A Desaturation by Particulate Fraction of Mycobacterium phlei*. J. Biochem., 1973. **74**: p. 405-413.
137. Lennarz, W., Scheuerbrandt, G and Bloch, K., *The Biosynthesis of Oleic and 10-Methylstearic Acids in Mycobacterium phlei*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 664-671.
138. Fulco, A.a.B., K, *Cofactor Requirements for the Formation of delta-9 Unsaturated Fatty Acids in Mycobacterium phlei*. J. Biol. Chem. , 1964. **239**: p. 993-997.
139. Kikuchi, S.a.K., T., *Isolation and Partial Characterization of a Very Long-Chain Fatty Acid Desaturation System from the Cytosol of Mycobacterium smegmatis*. J. Biochem., 1986. **99**: p. 723-731.
140. Chang, Y.a.F., BG. , *Identification of Rv3230c as the NADPH Oxidoreductase of a Two-Protein DesA3 Acyl-CoA Desaturase in Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Biochemistry, 2006. **45**: p. 13476-13486.
141. van Kessel, J.a.H., GF., *Recombineering in Mycobacterium tuberculosis*. Nature Methods, 2007. **4**: p. 147–152.
142. Niederweis, M., Danilchahka, O., *Mycobacterium tuberculosis porins and toxins and related methods*. 2012: USA.
143. Timm J, L.E., Gicquel B., *Escherichia coli-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to lacZ: the pJEM series*. J Bacteriol, 1994. **176**: p. 6749-6753.
144. van Kessel JC, H.G., *Mycobacterial recombineering*. Methods Mol Biol. , 2008. **435**: p. 203-215.
145. Blondelet-Rouault MH, W.J., Lebrihi A, Branny P, Pernodet JL., *Antibiotic resistance gene cassettes derived from the omega interposon for use in E. coli and Streptomyces*. Gene., 1997. **190**: p. 315-317.

146. Madiraju MV, Q.M., Rajagopalan M., *Development of simple and efficient protocol for isolation of plasmids from mycobacteria using zirconia beads*. Lett Appl Microbiol, 2000. **30**: p. 38-41.
147. Naglak TJ, H.D., Wang HY., *Chemical permeabilization of cells for intracellular product release*. Bioprocess Technol. , 1990. **9**: p. 177-205.
148. Sambrook, J., Fritsch, EF and Manniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual.*, ed. C.S. Harbor. 1989, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
149. Miller, J., *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria.*, ed. C.S. Harbor. 1992, N.Y: Laboratory, Cold Spring Harbor.
150. Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1979. **72**: p. 248–254.
151. Hazel, J.R., and Williams, E. E., *The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment*. Prog. Lipid Res., 1990. **29**: p. 167–227.
152. Guschina, I.a.H., JL., *Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms*. FEBS Lett., 2006. **580**: p. 5477–5483.
153. Baba Tuneko , K.K., Kusunose Emi , Kusunose Masamichi , and Yano Ikuya *Thermally Adaptive Changes of Mycolic Acids in Mycobacterium smegmatis*. J. Biochem., 1989. **106**: p. 81-86.
154. Los, D., Mironov, KS and Allakhverdiev, SI. , *Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions*. Photosynth Res., 2013.
155. Seiko Toriyama, I.Y., Masamiki Masui, Emi Kusunose, Masamichi Kusunose, and Norimi Akimori, *Regulation of Cell Wall Mycolic Acid Biosynthesis in Acid-Fast Bacteria. Temperature-Induced Changes in Mycolic Acid Molecular Species and Related compounds in Mycobacterium phlei*. J. Biochem., 1980. **88**: p. 211-221.
156. Toriyama S, Y.I., Masui M, Kusunose E, Kusunose M, Akimori N., *Regulation of cell wall mycolic acid biosynthesis in acid-fast bacteria. I. Temperature-induced changes in mycolic acid molecular species and related compounds in Mycobacterium phlei*. J Biochem, 1980. **88**: p. 211-221.
157. Kremer LGY, Gurcha SS, Loch C and Besra GS. . *Temperature-induced changes in the cell-wall components of Mycobacterium thermoresistibile*. Microbiology, 2002. **148**: p. 3145-3154.

158. Tomiyasu, I., *Mycolic acid composition and thermally adaptative changes in Nocardia asteroides*. J Bacteriol, 1982. **151**: p. 828-837.
159. Taneja R, M.U.a.K.G.K., *Effect of Growth Temperature on the Lipid Composition of Mycobacterium smegmatis ATCC 607*. Journal of General Microbiology, 1979. **113**: p. 413-416.
160. Stratton, HM, P.R.B., Carr EL., and Seviour, RJ, *Effects of Culture Conditions on the Mycolic Acid Composition of Isolates of Rhodococcus spp. from Activated SludgeFoams*. System. Appl. Microbiol., 2003. **26**: p. 165-171.
161. Merja, S.a.S., L *Changes in Fatty Acid Branching and Unsaturation of Streptomyces griseus and Brevibacterium fermentans as a Response to Growth Temperature Applied and Environmental Microbiology*, 1992. **58**: p. 2338-2340.
162. Takayama K, A.E., Davidson LA, Kunugi KA, Kilburn JO., *Effect of low temperature on growth, viability, and synthesis of mycolic acids of Mycobacterium tuberculosis strain H37Ra*. Am Rev Respir Dis., 1978. **118**: p. 113-117.
163. Kikuchi, S.a.K., T., *New Malonyl-CoA-Dependent Fatty Acid Elongation System in M. smegmatis*. J. Biochem., 1982. **92**: p. 839-844.
164. Wheeler, P., Bulmer, K and Ratledge, C., *Enzymes for biosynthesis de novo and elongation of fatty acids in mycobacteria grown in host cells: is M. leprae competent in fatty acid biosynthesis?* J.of General Microbiology, 1990. **136**: p. 211-217.
165. Yong-Mei, Z.a.C.O.R., *Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis*. J of Lipid Research, 2008: p. 115-119.
166. Rowbury, R., *Temperature effects on biological systems: introduction*. Sci Prog, 2003. **86**: p. 1-8.
167. Macartney AI, M.B., Cossins AR, *Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition.*, in *Temperature adaptation of biological membranes.*, C. AR, Editor. 1994, Portland: London. p. 129–139.
168. Los DA , M.N., *Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1666**: p. 142–157.
169. Newton-Foot M and Gey van Pittius, N., *The complex architecture of mycobacterial promoters*. Tuberculosis, 2013. **93**: p. 60-74.
170. Vemula, M, P.K., Oh, CS, Chellappa, R, Gonzalez, CI and Martin, CE., *Maintenance and Regulation of mRNA Stability of the Saccharomyces cerevisiae OLE1 Gene Requires Multiple Elements within the Transcript That Act through Translation-independent Mechanisms*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**: p. 45269–45279.

171. Cronan JE Jr, G.E., *An estimate of the minimum amount of unsaturated fatty acid required for growth of Escherichia coli*. J Biol Chem, 1973. **248**: p. 1188–1195.
172. Baldassare JJ, R.K., Silbert DF, *Modifications of membrane lipid: physical properties in relation to fatty acid structure*. Biochemistry, 1973. **15**: p. 2986–2994.
173. Garwin JL, C.J.J., *Thermal modulation of fatty acid synthesis in Escherichia coli does not involve de novo enzyme synthesis*. J Bacteriol, 1980. **141**: p. 1457–1459.
174. Grau R, G.D., Glikin GC, de Mendoza D, *DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 1994. **11**: p. 933–941.
175. Hurme R, R.M., *Temperature sensing in bacterial gene regulation— what it all boils down to*. Molecular Microbiology, 1998. **30**: p. 1–6.
176. Weber MH, K.W., Müller L, Niess UM, Marahiel MA, *Role of the Bacillus subtilis fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock*. Molecular Microbiology, 2001. **39**: p. 1321–1329.
177. Andersen J, D.N., *micF RNA binds to the 5' end of ompF mRNA and to a protein from Escherichia coli*. biochem 1990. **29**: p. 9249–9256.
178. Lease RA, B.M., *A trans-acting RNA as a control switch in Escherichia coli: DsrA modulates function by forming alternative structures*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 9919–9924.
179. Hoe NP, G.J., *Temperature sensing in Yersinia pestis: translation of the LerF activator protein is thermally regulated*. J Bacteriol, 1993. **175**: p. 7901–7909.
180. Romby P, E.C. (2003) *At the Xick of a switch: a Listeria mRNA turns on and off its own expression in response to temperature*. **Volume**,
181. Gulig PA, D.H., Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M, *Molecular analysis of spv virulence genes of the Salmonella virulence plasmid*. Molecular Microbiology, 1993. **7**: p. 825–830.
182. Hurme R, B.K., Namork D, Rhen M, *DNA binding exerted by a bacterial gene regulator with extensive coiled coil domains*. J Biol Chem, 1996. **272**: p. 12626–12631.
183. Hurme R, B.K., Normark SJ, Rhen M, *A proteinaceous gene regulatory thermometer in Salmonella*. Cell, 1997. **90**: p. 55–64.
184. Ramos, J.L., M.M.n.-B., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos MT, Brennan, R and Tobes, R, *The TetR Family of Transcriptional Repressors*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005. **69**: p. 326–356.

185. Engohang-Ndong, J., Baillat, D, Aumercier, M, Bellefontaine, F, Besra, GS, Locht, C and Baulard, AR., *EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator*. Mol. Microbiol., 2004. **51**: p. 175-188.
186. Choi JY, S.J., Hwang SY, Martin CE., *Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the Saccharomyces cerevisiae OLE1 gene*. J Biol Chem., 1996. **271**: p. 3581-3589.
187. Choi, K.a.S., HP., *An improved method for rapid generation of unmarked Pseudomonas aeruginosa deletion mutants*. BMC Microbiol, 2005. **5**: p. 30.
188. Yong-Mei Zhang, K.Z., Matthew W. Frank and Charles O. Rock, *A Pseudomonas aeruginosa transcription factor that senses fatty acid structure*. Molecular Microbiology, 2007. **66**: p. 622-632.
189. DiRusso, C., Heimert, TL and Metzger, AK., *Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in Escherichia coli. Interaction with the fadB promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 8685–8691.
190. Phetsuksiri, B., Jackson, M, Scherman, H, McNeil, M, Besra, GS, Baulard, AR, Slayden, RA, DeBarber, AE, Barry, CE, Baird, MS, Crick, DC, and Brennan, PJ., *Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(53123-53130).
191. Belardinelli, J., *Síntesis de ácidos micólicos en micobacterias: Identificación de productos génicos implicados en el mecanismo de acción de drogas anti-tuberculosas y en el mantenimiento de la barrera de impermeabilidad bacteriana.*, in *Cátedra de Microbiología, Parasitología y Virología, Facultad de Cs. Médicas*. 2012, Universidad Nacional de Rosario (UNR). Rosario.
192. Beranová, J., Mansilla, MC, de Mendoza, D, Elhottová, D and Konopásek, I *Differences in Cold Adaptation of Bacillus subtilis under Anaerobic and Aerobic Conditions*. J Bacteriol, 2010. **192**: p. 4164-4171.
193. Silbert DF, V.P., *Fatty acid mutant of E. coli lacking a beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1967. **58**: p. 1579-86.
194. Altabe, S., Lopez, P, and de Mendoza D., *Isolation and Characterization of Unsaturated Fatty Acid Auxotrophs of Streptococcus pneumoniae and Streptococcus mutans*. J Bacteriol, 2007. **189**: p. 8139–8144.

195. Resnick MA, M.R., 1966. Unsaturated fatty acid mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **92**: p. 597-600.
196. Goren, M., in *The Mycobacteria: A Source book*, G.P. Kubica, and Wayne, L. G., Editor. 1984, Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 379–415.
197. Parish, T., Liu, J, Nikaido, H, and Stoker, NG., *A Mycobacterium smegmatis mutant with a defective inositol monophosphate phosphatase gene homolog has altered cell envelope permeability*. J. Bacteriol., 1997. **179**: p. 7827–7833.
198. Morita, Y., Sena, CB, Waller, RF, Kurokawa, K, Sernee, MF, Nakatani, F, Haites, RE, Billman-Jacobe, H, McConville, MJ, Maeda, Y and Kinoshita, T., *PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria*. J Biol Chem, 2006. **281**: p. 5143–25155.
199. Korduláková, J., Gilleron, M, Mikusova, K, Puzo, G, Brennan, PJ, Gicquel, B and Jackson, M. , *Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria*. J Biol Chem., 2002. **277**: p. 31335-31344.
200. Bhatt A, B.A., Singh A, Minnikin DE, Besra GS., *Loss of a mycobacterial gene encoding a reductase leads to an altered cell wall containing beta-oxo-mycolic acid analogs and accumulation of ketones*. Chem Biol., 2008. **22**: p. 930-939.
201. Zhou XR, G.A., Singh SP., *Caenorhabditis elegans Delta12-desaturase FAT-2 is a bifunctional desaturase able to desaturate a diverse range of fatty acid substrates at the Delta12 and Delta15 positions*. J Biol Chem., 2011. **286**: p. 43644-43450.
202. Napier JA, M.L., *Genomic and functional characterization of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in Caenorhabditis elegans*. Lipids., 2001. **36**: p. 761-766.
203. Watts, J., *Fat synthesis and adiposity regulation in Caenorhabditis elegans*. Trends Endocrinol Metab., 2009. **20**: p. 58-65.
204. Damude, H., Zhang, H, Farrall, L, Ripp, KG, Tomb, JF, Hollerbach, D, Yadav, NS., *Identification of bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants*. Proc. Natl Acad Sci U S A., 2006. **103**: p. 9446-9451.
205. Hoffmann, M., Hornung, E, Busch, S, Kassner, N, Ternes, P, Braus, GH, Feussner, I., *A small membrane-peripheral region close to the active center determines regioselectivity of membrane-bound fatty acid desaturases from Aspergillus nidulans*. J Biol Chem. , 2007. **282**: p. 26666-26674.

206. Xiaoyuan C, Q.Y., Fangqing Z, Song Q, Yu Y, Junjun S and Hanzhi L, *Comparative Analysis of Fatty Acid Desaturases in Cyanobacterial Genomes*, in *Comp Funct Genomics*. . 2008.
207. Nakashima, S., Zhao, Y and Nozawa, Y. , *Molecular cloning of delta-9 fatty acid desaturase from the protozoan Tetrahymena thermophila and its mRNA expression during thermal membrane adaptation*. Biochem, 1996. **317**: p. 29-34.
208. Meesters, P., Springer, J and Eggink, G. , *Cloning and expression of the delta 9 fatty acid desaturase gene from Cryptococcus curvatus ATCC 20509 containing histidine boxes and a cytochrome b5 domain*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997. **47**: p. 663-667.
209. Irazu, C., Gonzalez-Rodriguez, S and Brenner, RR. , *Delta 5 desaturase activity in rat kidney microsomes*. Mol. Cell. Biochem., 1993. **129**: p. 31-37.
210. Brenner, R., *Regulatory function of delta-6 desaturase. Key enzyme of polyunsaturated fatty acid synthesis*. Adv. Exp. Med. Biol., 1977. **83**: p. 85-101.
211. Gargano, S., Di Lallo, G, Kobayashi,GS and Maresca, B. , *A temperature-sensitive strain of Histoplasma capsulatum has an altered delta9-fatty acid desaturase gene*. Lipids., 1995. **30**: p. 899-906.
212. Thiede, M., Ozols, J and Strittmatter, P. , *Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase*. J. Biol. Chem., 1986. **261**: p. 13230-13235.
213. Anamnart, S., Tomita,T, Fukui, Fujimori, FK, Harashima, S, Yamada, Y and Oshima, Y. , *The P-OLE1 gene of Pichia angusta encodes a delta-9-fatty acid desaturase and complements the ole1 mutation of Saccharomyces cerevisiae*. Gene., 1887. **184**: p. 299-306.
214. Luo, C., McSwain, JL, Tucker, JS and Sauer, RC., Essenberg, *Cloning and sequence of a gene for the homologue of the stearyl-CoA desaturase from salivary glands of the tick Amblyomma americanum*. Insect. Mol. Biol., 1997. **6**: p. 267-271.
215. Wada, H., Schmidt, H.,Heinz, E. and Murata, N. , *In vitro ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes*. J. Bacteriol., 1993. **175**: p. 544-547.
216. Wada, H., Avelange-Macherel, MH and Murata, N. , *The desA gene of the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803 is the structural gene for delta-12 desaturase*. J Bacteriol, 1993. **175**: p. 6056-6058.
217. Reddy, A., Nuccio, ML, Gross, LM and Thomas, TL. , *Isolation of a delta-6 desaturase gene from the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in Anabaena sp. strain PCC 7120.* Plant Mol. Biol., 1993. **22**: p. 293-300.

218. Sakamoto, T., Wada, Nishida, H, Ohmori, IM and Murata, N., *Delta-9 Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups*. J. Biol. Chem., 1994. **269**: p. 25576-25580.
219. Sakamoto, T.a.B., DA. , *Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC7002*. Mol. Microbiol., 1997. **23**: p. 1281-1292.
220. Wada, H., Gombos, Z and Murata, N. , *Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation*. Nature, 1990. **374**: p. 200-203.
221. Sakamoto, T., Los, DA, Higashi, S, Wada, H, Nishida, I, Ohmori, M and Murata, N., *Cloning of delta-3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membranelipid unsaturation*. Plant Mol. Biol., 1994. **26**: p. 249-263.
222. Tocher DR, L.M., Hodgson PA., *Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases*. Prog Lipid Res., 1998. **37**: p. 73-117.
223. Shanklin, J.a.C., EB *Desaturation and related modifications of fatty acids*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., 1998. **49**: p. 611-641.
224. Sayanova, O., Smith, MA, Lapinskas, P, Stobart, AK, Dobson, G, Christie, WW, Shewry, PR and Napier, JA., *Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta-6 desaturated fatty acids in transgenic tobacco*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**: p. 4211-4216.
225. Parish, T., Mahenthiralingam, E, Draper, P, Davis, EO and Colston, MJ., *Regulation of the inducible acetamidase gene of Mycobacterium smegmatis*. Microbiology, 1997. **143**: p. 2267-2276.
226. Parish, T., Turner, J and Stoker, NG., *amiA is a negative regulator of acetamidase expression in Mycobacterium smegmatis*. BMC Microbiology, 2001. **1**: p. 19.
227. Roberts, G., Muttucumaru, DGN and Parish, T., *Control of the acetamidase gene of Mycobacterium smegmatis by multiple regulators*. FEMS Microbiol. Lett., 2003. **221**: p. 131-136.
228. van Kessel, J., Marinelli, LJ. and Hatfull, GF. , *Recombineering mycobacteria and their phages*. Nature Reviews, 2008. **6**: p. 851-857.
229. Parish T, S.N., *Development and use of a conditional antisense mutagenesis system in mycobacteria*. FEMS Microbiol Lett. , 1997, **154**: p. 151-157.

230. Singh, V., Chandra, D ,Srivastava, BS and Srivastava, R *Downregulation of Rv0189c, encoding a dihydroxyacid dehydratase, affects growth of Mycobacterium tuberculosis in vitro and in mice.* Microbiology, 2011. **157**: p. 38-46.
231. Wilson T, d.L.G., Marcinkeviciene JA, Blanchard JS, Collins DM., *Antisense RNA to ahpC, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that AhpC of Mycobacterium bovis has virulence properties.* Microbiology., 1998. **144**: p. 2687-2695.
232. Kang, J., Xu, L, Yang, S, Yu, W, Liu, S, Xin, Y and Ma, Y, *Effect of Phosphoglucosamine Mutase on Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibilities in M. smegmatis glmM Gene Knockdown Strain.* PLOS ONE, 2013. **8**(4): p. 1-8.
233. Golby P, N.J., Witney A, Hinds J, Quail MA, Bentley S, Harris S, Smith N, Hewinson RG, Gordon SV., *Genome-level analyses of Mycobacterium bovis lineages reveal the role of SNPs and antisense transcription in differential gene expression.* BMC Genomics, 2013. **14**: p. 710.
234. Franch T, G.K., *Programmed cell death in bacteria: translational repression by mRNA end-pairing.* Mol. Microbiol., 1996. **21**: p. 1049-1060.
235. Kulyté, A., Nekhotiaeva, N, Awasthi, SK and Good, L, *Inhibition of Mycobacterium smegmatis Gene Expression and Growth Using Antisense Peptide Nucleic Acids.* J Molec. Microb. and Biotechn., 2005. **9**: p. 101-109.
236. Cronan, J., Birge, CH and Vagelos, PR., *Evidence for two genes specifically involved in unsaturated fatty acid biosynthesis in Escherichia coli.* J Bacteriol, 1969. **100**: p. 601-604.
237. Marrakchi , H., Choi, K.H., and Rock, C.O., *A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in Streptococcus pneumoniae.* J Biol Chem, 2002. **277**: p. 44809–44816.